



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Estudio de la resistencia a insecticidas en
triatominos y búsqueda de nuevos blancos
endocrinos para su control***

Tesista: Lic. Natalia Capriotti

Director/a: Dra. Sheila Ons

Año: 2018

El presente trabajo de Tesis se realizó en el Laboratorio de Neurobiología de Insectos del Centro Regional de Estudios Genómicos de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Sheila Ons. Se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata a fin de acceder al Grado Académico de Doctor en el Área Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas.

RESUMEN

Los programas de control de Chagas, tanto en Argentina como en el resto de Latinoamérica, han estado basados en la utilización de insecticidas neurotóxicos, principalmente piretroides. La reducción de la población del vector sigue siendo en la actualidad la opción más viable en cuanto a estrategias de prevención. Se han identificado poblaciones de *Triatoma infestans* con moderadas o altas tasas de resistencia a piretroides en áreas endémicas, lo cual se correlaciona con fracasos en las campañas de control. En este trabajo de Tesis Doctoral se abordó la problemática de la resistencia a piretroides en *T. infestans* y su relación con mutaciones puntuales en el canal de sodio dependiente de voltaje, sitio de acción de dichos insecticidas. Se logró establecer la sensibilidad de un ensayo de detección para una mutación puntual asociada a resistencia (L925I) y se validó el método para el estudio de frecuencias de esta mutación.

Frente a las limitaciones de los métodos de control de vectores empleados hasta la fecha, resulta importante enfocar esfuerzos para conseguir insecticidas más seguros para la salud humana y el medio ambiente, a la vez que selectivos en sus mecanismos de acción para la especie a combatir. Los neuropéptidos y sus receptores, moléculas clave en la señalización y regulación hormonal, son un posible blanco de insecticidas de nueva generación. Para ello es necesario estudiar su estructura, bioquímica

y función biológica, dado que los neuropéptidos intervienen en los eventos fisiológicos fundamentales del ciclo de vida. En esta Tesis se realizó un *screening* de la posible función diurética y/o antidiurética de distintos neuropéptidos en el insecto *Rhodnius prolixus*, y además se evaluó su función miotrópica. Los resultados apuntan hacia una implicación del neuropéptido CCH amida en la diuresis, y de los neuropéptidos sNPF y Orcoquininas en la regulación de la actividad contráctil en distintos tejidos. Hasta el desarrollo de esta Tesis Doctoral, no se tenía conocimiento de la función de estos neuropéptidos en triatomíneos.

Palabras Claves:

Mutaciones kdr - Piretroides - Canal de sodio dependiente de voltaje - Neuropéptidos Diuresis - Efecto mioregulatorio

AGRADECIMIENTOS

Durante el transcurso de este trabajo de Tesis me han acompañado muchas personas, a todos ellos, mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar le agradezco a mi directora, Dra. Sheila Ons, por todos estos años de trabajo, por darme un lugar en su grupo y por confiar en mí, por la dedicación y el compromiso en la tarea de dirigir esta Tesis y por seguir acompañándome en mi formación en el mundo científico.

Al Dr. Juan Ianowski por brindarme la posibilidad de hacer una estadía en su laboratorio. A él y a Paula, por la paciencia que tuvieron enseñándome el ensayo de Ramsay.

A la gente del Labo3 por siempre darme una mano con cada cosa que necesite y por crear un grupo donde reina el compañerismo y la buena onda. Infinitas gracias por la ayuda en el trabajo diario, la visión crítica en la realización de los experimentos y el aporte constructivo. Son excelentes compañeros y grandes personas.

A mis Ángeles (Lu e Ivi) por ser las mejores compañeras y amigas de doctorado que una persona puede encontrar en este camino. Nos formamos casi juntas. Entre equivocaciones y experimentos fallidos, celebrando los pequeños y grandes resultados que cada una obtenía, aportando cada una su visión distinta de las cosas, generando discusiones y críticas constructivas, compartiendo viajes, congresos, mates, salidas, risas y llantos...me han enseñado un montón a lo largo de estos años y han sido un sostén enorme. ¡Gracias de corazón por estar siempre!

A mi familia. En especial a mi papá, a mi mamá y a mi hermana, por su apoyo incondicional, su aliento y paciencia durante todo este tiempo (y siempre).

A David, por creer en mí, por sostenerme en los momentos de incertidumbre e incentivarme a seguir en esta carrera.

A mis amigas de Perga, por estar a la distancia y por su acompañamiento de años.

Índice de contenido

<u>1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</u>	<u>13</u>
1.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	14
1.2 INSECTOS TRIATOMINOS COMO VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	18
1.3 MÉTODOS DE CONTROL DE INSECTOS TRIATOMINOS.....	19
1.4 TRIATOMA INFESTANS: PRINCIPAL VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL CONO SUR.....	22
1.5 RESISTENCIA A INSECTICIDAS.....	23
1.6 MECANISMOS DE RESISTENCIA A INSECTICIDAS NEUROTÓXICOS..	25
1.6.1 DETOXIFICACIÓN METABÓLICA DE INSECTICIDAS NEUROTÓXICOS	25
1.6.2 AUMENTO DEL GROSOR CUTICULAR Y DISMINUCIÓN DE LA PENETRACIÓN CUTICULAR.....	28
1.6.3 MODIFICACIONES ASOCIADAS AL COMPORTAMIENTO.....	29
1.6.4 INSENSIBILIDAD AL SITIO BLANCO.....	30
1.7 CANAL DE SODIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE COMO SITIO DE ACCIÓN DE LOS PIRETROIDES.....	30
1.8 RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN TRIATOMINOS.....	36
1.9 PROBLEMAS DE LOS INSECTICIDAS NEUROTÓXICOS Y MANEJO INTEGRADO DE VECTORES.....	38
1.10 NEUROPEPTIDOS EN INSECTOS.....	39
1.11 EL SISTEMA NEUROSECRETOR EN RHODINUS PROLIXUS.....	48
1.12 RHODNIUS PROLIXUS COMO MODELO DE ESTUDIO EN LA FISIOLÓGÍA DE INSECTOS.....	50
1.13 SISTEMA EXCRETOR EN INSECTOS.....	51

1.13.1 DIURESIS POSTPRANDIAL EN TRIATOMINOS	53
1.13.2 FACTORES DIURÉTICOS Y ANTIDIURÉTICOS EN <i>R. PROLIXUS</i> ...	54
1.14 SISTEMA CIRCULATORIO EN INSECTOS.....	58
1.14.1 PÉPTIDOS CON ACCIÓN MIOTRÓPICA.....	60
<u>2. OBJETIVOS GENERALES</u>	<u>66</u>
<u>3. RESULTADOS</u>	<u>68</u>
3.1 CAPÍTULO 1. RESISTENCIA A INSECTICIDAS PIRETROIDES EN <i>T. INFESTANS</i> E IMPLICANCIA DE LAS MUTACIONES KDR EN EL CANAL SODIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE.	69
3.1.1 INTRODUCCIÓN	69
3.1.2 RESULTADOS	72
3.1.2.1 GENOTIPIFICACIÓN DEL DOMINIO II DEL CANAL DE SODIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE EN POBLACIONES DE <i>T. INFESTANS</i> SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A PIRETROIDES	72
3.1.2.2 PRESENCIA DE LA MUTACIÓN KDR L925I EN POBLACIONES DE GRAN CHACO.....	74
3.1.2.3 DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD DEL ENSAYO REA.	74
3.1.2.4 ESTIMACIÓN DE FRECUENCIAS DE MUTACIONES EN POBLACIONES DEL GRAN CHACO	75
3.1.3 DISCUSIÓN	77
3.2 CAPÍTULO 2. <i>SCREENING</i> FUNCIONAL DE NEUROPÉPTIDOS EN LA DIURESIS EN <i>R. PROLIXUS</i>	80
3.2.1 INTRODUCCIÓN	80
3.2.2 RESULTADOS	94
3.2.2.1 EFECTO DE ALATOTROPINA.....	94
3.2.2.4 EFECTO DE PRECURSOR DE NEUROPÉPTIDOS 1 (<i>NPLP1</i>).....	98
3.2.2.5 <i>ORCOKININA A</i>	99
3.2.2.6 <i>ORCOKININA B</i>	100

3.2.2.7 PÉPTIDO TRANSPORTADOR DE IONES	101
3.2.2.8 SHORT NEUROPEPTIDE F	102
3.2.2.9 TAQUIKININA	103
3.2.2.10 EFECTO DE CCHAMIDA (CCHA) EN LA DIURESIS	104
3. 2. 3 DISCUSIÓN	105
3.3 CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE CCHAMIDA EN LA DIURESIS POSTPRANDIAL DEL INSECTO <i>RHODNIUS PROLIXUS</i> , VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	106
3.3.1 INTRODUCCIÓN	106
3.3.2 RESULTADOS	114
3.3.2.1. PERFIL DE EXPRESIÓN DE CCHAMIDA Y SUS RECEPTORES.	114
3.3.2.2 EVALUACIÓN DEL PAPEL DE CCHAMIDA EN LA DIURESIS POST PRANDIAL.	115
3.3.2.3 ESTUDIO DE TRANSPORTE DE FLUIDOS EN TÚBULOS DE MALPIGHI EN INSECTOS CON EXPRESIÓN DE CCHA SILENCIADA.	118
3.3.2.4 VALIDACIÓN DE LA CAÍDA DE TRANSCRIPTO DE CCHA MEDIANTE QRT-PCR	119
3.3.2.5 CCHAMIDA REGULA EL TRANSPORTE DE FLUIDOS EN INTESTINO MEDIO ANTERIOR	120
3.3.2.6 ESTUDIO DE LA ACCIÓN CARDIOREGULATORIA DE CCHAMIDA	122
3.3.3 DISCUSIÓN	123
3.4 CAPÍTULO 4. NEUROPEPTIDOS REGULADORES DE LA ACTIVIDAD MIOTRÓPICA EN <i>R. PROLIXUS</i>	125
3.4.1 INTRODUCCIÓN	125
3.4.2 RESULTADOS	130
3.4.2.1 ORCOQUININAS: ESTUDIO DE SU ACCIÓN CARDIO- Y MIOTRÓPICA.	130

3.4.2.2 sNPF Y SU ROL EN LA CONTRACCIÓN DE TEJIDOS. ESTUDIO DE ANÁLOGOS PEPTÍDICOS DE sNPF.....	134
3.4.3 DISCUSIÓN.....	142
<i>4. DISCUSIÓN GENERAL</i>	<i>145</i>
<i>5. CONCLUSIONES.....</i>	<i>150</i>
<i>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</i>	<i>153</i>
6.1 INSECTOS.....	154
6.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	155
6.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	155
6.2.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	156
6.2.3 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	158
6.2.4 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.....	158
6.2.5 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS.....	159
6.2.6 TRANSFORMACIÓN EN BACTERIAS COMPETENTES.....	159
6.2.7 PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	160
6.2.8 SECUENCIACIÓN DE FRAGMENTOS.....	160
6.2.9 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS Y ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD EN SITIOS PUNTUALES.....	161
6.2.10 VALIDACIÓN DEL ENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN L925I EN POBLACIONES DE GRAN CHACO.....	161
6.2.11 SENSIBILIDAD DEL ENSAYO RESTRICTION ENDONUCLEASE ASSAY (REA).....	162
6.2.12 DISECCIÓN DE TEJIDOS Y EXTRACCIÓN DE ARN.....	163
6.2.13 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc).....	164
6.2.14 SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE LA TÉCNICA DE ARN DE INTERFERENCIA: SÍNTESIS DE ARN DOBLE CADENA.....	165

6.2.15 EXTRACCIÓN FENOL: CLOROFORMO: ISOAMILICO Y PRECIPITACIÓN CON AcNA	166
6.2.16 INYECCIÓN DE INSECTOS PARA ARN DE INTERFERENCIA.	167
6.2.17 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE ARN DE INTERFERENCIA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (QRT-PCR).	167
6.3 TÉCNICAS DE FISIOLÓGÍA.....	168
6.3.1 ENSAYO DE RAMSAY.....	168
6.3.2 ENSAYOS DE TRANSPORTE DE FLUIDOS EN INTESTINO ANTERIOR.	171
6.3.3 ENSAYOS DE CONTRACCIÓN DE TEJIDOS.	173
6.3.4 ESTUDIO DE EXCRECIÓN IN VIVO.	174
6.4 PÉPTIDOS Y ANÁLOGOS PEPTÍDICOS.	174
6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	175
<u>7. REFERENCIAS</u>	<u>176</u>
<u>8. ANEXOS.....</u>	<u>201</u>
8.1 TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	201
8.2 TABLA DE PÉPTIDOS Y ANÁLOGOS	203
8.3 BUFFERS Y SOLUCIONES UTILIZADOS	204

1. Introducción General

1.1 Enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad tropical desatendida causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Se estima que más de 8 millones de personas están infectadas con *T. cruzi* en todo el mundo, y 25 millones se encuentran en riesgo de contraerla (WHO, 2012). Es considerada endémica en 21 países de América Latina. El aumento reciente en la incidencia de la enfermedad se ha informado en áreas no endémicas, debido a las tendencias de la migración intercontinental de individuos infectados procedentes del subcontinente latinoamericano (WHO, 2012). En la **Figura 1.1** se observa la prevalencia de *T. cruzi* en áreas endémicas y no endémicas del continente americano.

Las últimas estimaciones de casos (OPS, 2015) indican que en Argentina habría 7.300.000 personas expuestas y 1.505.235 infectadas. Las regiones con alto riesgo para la transmisión vectorial comprenden las provincias de Chaco, Formosa, Salta, Santiago del Estero, San Juan y Mendoza. Las provincias de Córdoba, Corrientes, La Rioja, Salta, y Tucumán, muestran una situación de riesgo intermedio con un índice de reinfestación mayor al 5% en algunos departamentos, e insuficiente cobertura de vigilancia en algunos casos (<http://www.msal.gob.ar/chagas>).

La enfermedad de Chagas fue descrita por primera vez en 1909 por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1879-1934). Su trabajo constituye un hito en la historia de la medicina, ya que describió con gran detalle el ciclo completo de transmisión (vector, hospedador y agente infeccioso) y las manifestaciones clínicas de esta afección (Franco-Paredes *et al.*, 2009). En la República Argentina, el médico Salvador Mazza inicia los primeros estudios sobre esta enfermedad en la Provincia de Jujuy con la creación de la Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (MEPRA). Su trabajo se basó en la descripción de manifestaciones clínicas, fisiopatología, diagnóstico laboratorial, tratamiento y reservorios asociados. Además, describió los primeros casos clínicos de la enfermedad en nuestro país (<http://new.paho.org>).

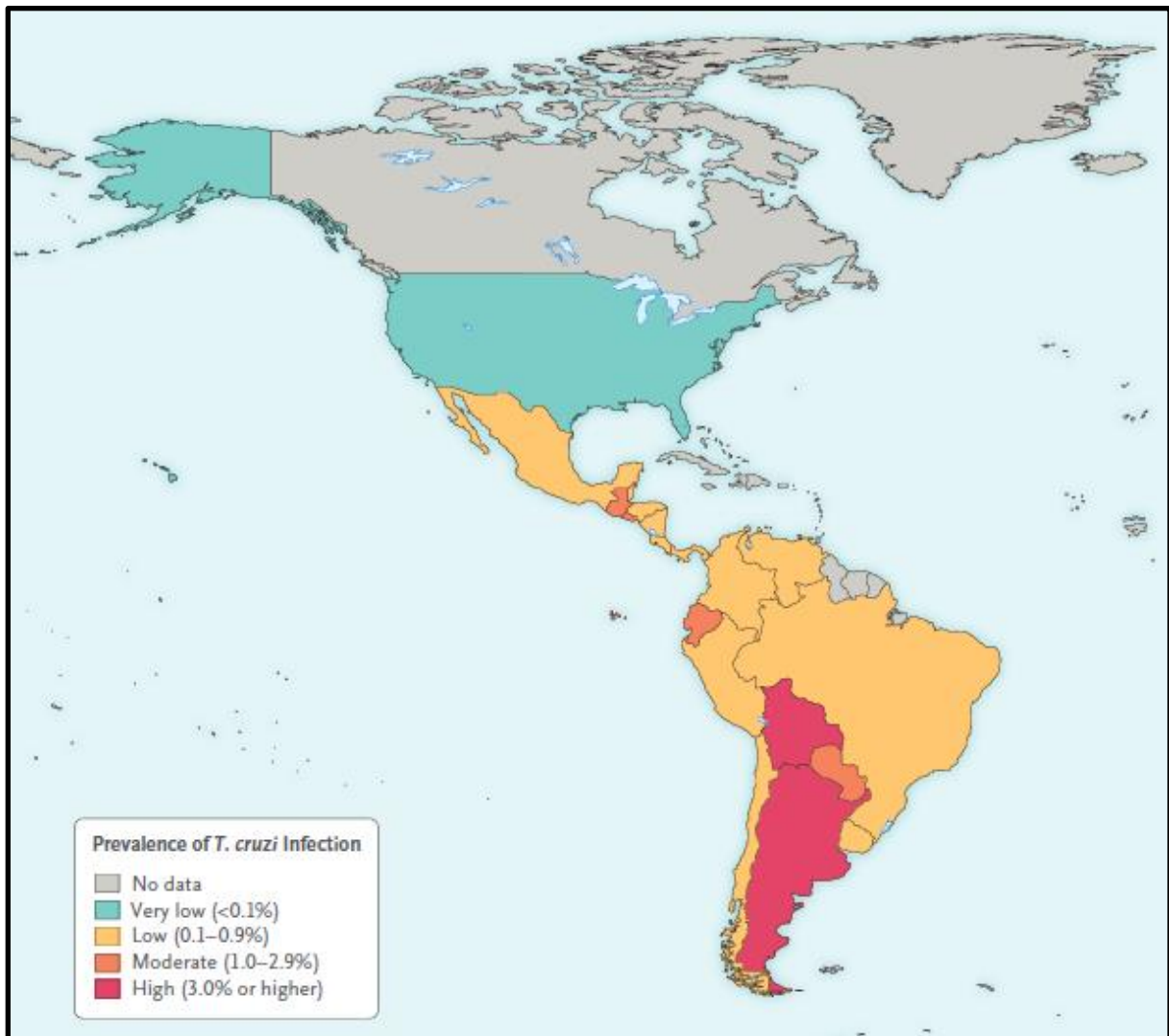


Figura 1.1: Prevalencia estimada de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Se muestran las prevalencias a nivel nacional, calculadas sobre la base de los datos publicados (Wkly Epidemiol Rec., 2015). La transmisión se concentra en áreas con infestación de vectores domésticos y, por lo tanto, muestra un fuerte agrupamiento espacial. Sin embargo, debido a que la infección es de por vida dada la ausencia de tratamientos efectivos, la prevalencia refleja la transmisión durante décadas y los patrones humanos de migración. Imagen extraída de (Bern, 2015)

El modo de transmisión más frecuente de *T. cruzi* es a través de las heces de los insectos de la subfamilia Triatominae. Las especies más importantes como vectores son *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* y *Triatoma dimidiata*. Estos insectos depositan las heces infectadas con el parásito sobre la piel del huésped, durante e inmediatamente después de la ingesta de sangre. Otros modos de transmisión incluyen: transmisión vertical de la madre al feto que conduce a la enfermedad de Chagas congénita, por

trasplante de órganos y por transfusión de sangre u otros productos sanguíneos (Rassi e Marin-Neto, 2010).

Se presentan 3 fases bien definidas en esta enfermedad: fase aguda, fase indeterminada y fase crónica. La fase aguda comienza entre los 6 a 10 días y hasta 2 meses después de haber contraído el parásito, el paciente puede o no presentar síntomas. Entre los más frecuentes se describen: fiebre, hepatoesplenomegalia, diarrea, vómitos, cefaleas, convulsiones, cansancio, irritabilidad, falta de apetito y mialgias. El signo de Romaña y el chagoma cutáneo de inoculación son signos asociados a la puerta de entrada del parásito, observados frecuentemente en niños. La letalidad en fase aguda se presenta sobre todo en niños o inmunosuprimidos y suele asociarse a complicaciones cardíacas o del sistema nervioso central (Añez *et al.*, 1999; Rassi e Marin-Neto, 2010). Esta fase puede durar entre dos y cuatro meses, y se caracteriza por una parasitemia elevada, siendo relativamente sencilla la identificación de *T. cruzi* en muestras de sangre (WHO, 2002). La recuperación de esta fase suele ser espontánea, no obstante; en este período se presenta la mejor oportunidad de curación mediante tratamiento con drogas parasiticidas. Muchas veces la fase aguda pasa desapercibida perdiendo la posibilidad de tratar al paciente. El tratamiento con nifurtimox o benznidazol durante esta etapa suele lograr la cura parasitológica en niños infectados. Sin embargo, la eficacia del tratamiento en adultos solo alcanza el 56 % (Blanco *et al.*, 2000). Los bebés que contraen Chagas por vía congénita se pueden curar, mientras que los niños menores de 15 años tienen muchas posibilidades de curarse dependiendo de la celeridad con que reciban tratamiento luego de adquirida la infección.

La fase indeterminada es asintomática y sólo puede ser detectada mediante pruebas diagnósticas indirectas, dada la dificultad de detección del parásito. El 70-85 % de las personas infectadas continúan en esta etapa durante toda la vida (Bern, 2015).

En la fase crónica se desarrolla la “enfermedad” de Chagas propiamente dicha. Alrededor de un 30 % de los individuos infectados con *T. cruzi* derivan a esta fase al cabo de 10 a 20 años después de la infección. Las manifestaciones son consecuencia de lesiones orgánicas irreversibles y progresivas. El daño se hace evidente en el desarrollo de las alteraciones cardíacas y/o digestivas (Dias E Fau - Laranja *et al.*, 1956; Rosenbaum Mb Fau - Cerisola e Cerisola, 1961). El compromiso cardíaco es la manifestación más frecuente e importante en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas en la Argentina (Rosenbaum Mb Fau - Cerisola e Cerisola; Rosenbaum, 1964). Las manifestaciones digestivas como el megacolon y megaesófago se han descripto principalmente en

pacientes de Brasil, donde la prevalencia de esta patología es tres veces mayor que en otras áreas endémicas (Dias, 1994). En esta etapa, la parasitemia es transitoria, por lo que la detección del parásito en sangre es totalmente aleatoria y de baja sensibilidad. En los pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica el tratamiento es fundamentalmente sintomático y tiene como fin contrarrestar las alteraciones del funcionamiento cardíaco. Se han llevado a cabo estudios de tratamiento en pacientes adultos con drogas parasitocidas. TRAENA fue un ensayo clínico aleatorizado y BENEFIT un estudio multicéntrico, cuyos resultados mostraron negativización serológica y disminución de la carga parasitaria. Sin embargo, el tratamiento no logró detener la progresión de la patología cardíaca hacia formas más severas (Morillo *et al.*; 2015).

La enfermedad de Chagas sigue siendo una causa importante de incapacidad y muerte prematura. Las drogas disponibles en la actualidad presentan severas limitaciones y la cura depende de la fase, la edad del paciente, las condiciones fisiológicas y la susceptibilidad de la cepa de *T. cruzi* (Andrade e Gontijo, 2008). Una gran variabilidad genética de la población del parásito y la existencia de cepas naturalmente resistentes a las drogas utilizadas son limitantes para el tratamiento (Villarreal, 2004; Seco Hidalgo, 2015). Por esto, la estrategia más utilizada sigue siendo el control de la población de los insectos vectores a través de insecticidas neurotóxicos. Sin embargo, el uso extendido de estos insecticidas propició el surgimiento de focos de poblaciones de *T. infestans* de altísima resistencia en la ecoregión del Gran Chaco, y las consecuentes fallas de los tratamientos de rociado (Cueto *et al.*, 2005; Picollo *et al.*, 2005; Gürtler *et al.*, 2007; Mougabure-Cueto e Picollo, 2015; Pessoa *et al.*, 2015). Por lo anterior, es importante implementar el manejo de la resistencia en las campañas de control de triatomíneos. La detección temprana de focos de resistencia resulta esencial a fin de proponer compuestos alternativos de manera racional. En este contexto resulta relevante el estudio de las causas de la resistencia a insecticidas en triatomíneos. Además, a mediano plazo, es necesaria la búsqueda de nuevos blancos de insecticidas que puedan complementar o reemplazar a los neurotóxicos dentro de estrategias de manejo integrado. Idealmente, los insecticidas de nueva generación deberían ser efectivos y específicos para la especie a combatir, sin afectar a insectos benéficos, y no acumulables en el medio ambiente.

1.2 Insectos triatominos como vectores de la enfermedad de Chagas.

Los triatominos son insectos pertenecientes al orden Hemiptera, suborden Heteroptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae (Tartarotti e Ceron, 2005). Se distinguen por poseer alas en forma de hemiélitros y aparato bucal picador-suctor con hábitos de alimentación nocturnos y exclusivamente hematófagos. Entre sus rasgos biológicos se destacan su elevada capacidad de ayuno, adaptación al ambiente domiciliario y a diferentes condiciones climáticas. El ciclo de vida involucra cinco estadios ninfales previos al adulto (Schofield, 1978). Son vectores biológicos de *T. cruzi* tanto en el ambiente doméstico como silvestre. Durante el día, estos insectos viven y se refugian en grietas que se forman en las paredes de las viviendas, por lo que las construcciones de adobe resultan un ambiente con abundancia de refugios. Por la noche, los insectos detectan diversas señales como la temperatura y el CO₂ exhalados por el huésped, que los atraen a la zona de la cara y la boca, donde ocurre la mayoría de las picaduras (Cooper, 2011).

Hasta el momento se han descrito 140 especies de triatominos (Costa e Lorenzo, 2009). En Latinoamérica las especies domiciliadas más importantes implicadas en la transmisión de *T. cruzi* son *T. infestans* (en los países del Cono Sur), *R. prolixus* (en Centroamérica y el norte de Sudamérica), y *T. dimidiata* (que se extiende a lo largo de la Costa Pacífica desde México hasta el Ecuador y el norte de Perú) (Rassi e Marin-Neto, 2010). En la **Figura 1.2** se muestran las principales especies de insectos Triatominos y su localización geográfica.

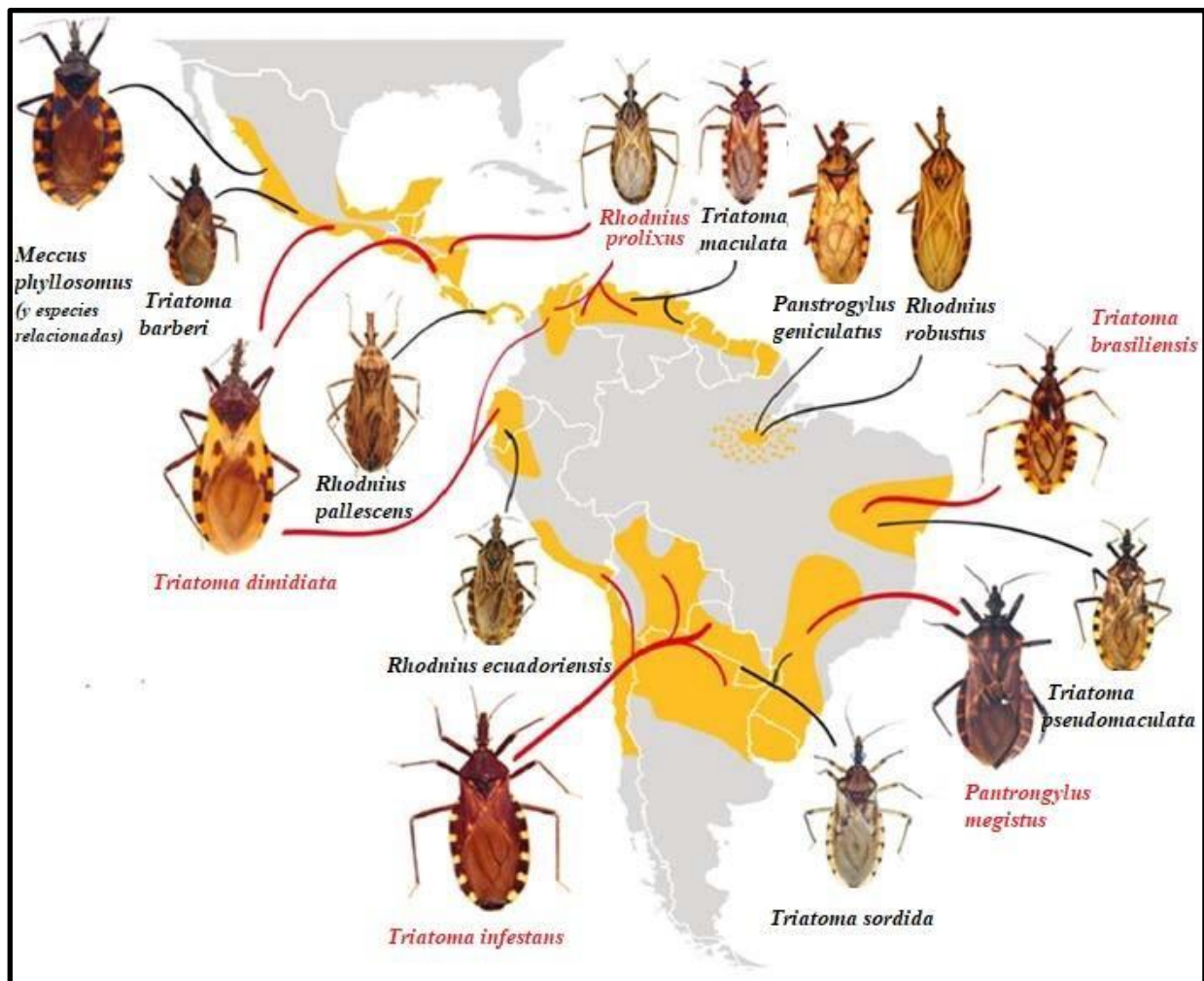


Figura 1.2: Mapa de las regiones endémicas de Chagas en América Central y América del Sur y su asociación con las 14 especies de vectores más importantes. Las cinco especies de Triatominos vectores más importantes y sus regiones asociadas se indican en rojo. Imagen extraída y modificada del libro “*American Trypanosomiasis Chagas Disease. One Hundred Years of Research*” Segunda Edición. Capítulo 5. Editado por Telleria y Tibayrenc (2017).

1.3 Métodos de control de insectos triatominos.

Entre 1943 y 1960, las estrategias de control de Chagas estaban focalizadas en dos aspectos: a) control vectorial y b) caracterización clínica de miocardiopatías asociadas. La primera involucraba la implementación de métodos físicos y/o químicos, tales como el rociado de las paredes de las viviendas con agua hirviendo, soda cáustica y/o querosene. Los mejores resultados durante ese período fueron obtenidos mediante la aplicación de una mezcla del insecticida rotenona con querosene, en conjunto con la mejora de las

condiciones edilicias de los hogares y la educación sanitaria (Dias e Schofield, 1998). La caracterización clínica de miocardiopatías exigía del desarrollo de una estructura de investigación compleja con la inclusión de cardiólogos, médicos clínicos, serólogos y patólogos. Los primeros estudios clínicos fueron realizados entre 1945 y 1956, y se centraban en la caracterización de patologías cardíacas. En 1956 se publicaron las primeras conclusiones acerca de la cardiopatía chagásica en *Circulation*, obra considerada como la contribución definitiva acerca de las características de la cardiopatía chagásica crónica (Schofield e Dias, 1999).

Desde la década de 1960, las campañas de eliminación de *T. infestans* se basan en la utilización de insecticidas neurotóxicos. Los primeros productos químicos eran compuestos organoclorados (β -hexaclorociclohexano (BHC), dieldrina), organofosforados (malatión, fenitrotión), carbamatos (propoxur) y piretroides (ciflutrina). Los mismos presentaban las ventajas de ser baratos y relativamente eficaces, pero su poder residual era muy limitado en las paredes de las viviendas de barro poroso y hábitats peridomésticos.

Uno de los insecticidas sintéticos más importante en cuanto al control de insectos de importancia sanitaria es el organoclorado DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano). Su uso fue potenciado dada su alta toxicidad, aunque presentaba importantes inconvenientes: baja selectividad, acumulación en tejidos grasos y persistencia prolongada en el medio ambiente. La utilización del DDT no brindó resultados satisfactorios para el control de triatomíneos, por lo que se probaron otros insecticidas organoclorados (Dias e Schofield, 1998; Mougabure-Cueto e Picollo, 2015). El lindano y el dieldrín fueron candidatos alternativos para el control vectorial de Chagas. Solo el isómero δ del hexaclorociclohexano (lindano) mostró actividad insecticida contra *T. infestans*, y fue el primer insecticida sintético para el control de triatomíneos a campo. El lindano se usó durante varios años en Argentina y Brasil, y el dieldrín se introdujo en Venezuela para el control de *R. prolixus*. El lindano y / o el dieldrín fueron los compuestos más utilizados contra triatomíneos domésticos hasta finales de 1970, cuando fueron reemplazados progresivamente por insecticidas sintéticos más modernos (Mougabure-Cueto e Picollo, 2015).

El uso de los insecticidas piretroides surge a partir de la década del '70. Dada su rápida efectividad a bajas dosis, sumado a su bajo costo y relativa seguridad sanitaria, la aplicación de los piretroides se extendió rápidamente como la principal estrategia de control. Los piretroides son insecticidas sintéticos, derivados de sus análogos naturales:

las piretrinas (Hitmi *et al.*, 2000). Químicamente son ésteres, es decir provienen de la combinación de un ácido con un alcohol. Presentan rápido efecto contra los insectos al vuelo y baja toxicidad en mamíferos (Soderlund, 1992). Los primeros piretroides eran lábiles a la luz y el aire, lo que impedía su aplicación en prácticas donde se requería poder residual. Numerosas modificaciones fueron producidas en su estructura química durante el período comprendido entre 1924 y 1970. Elliott, M. (1980) logró el desarrollo de los primeros compuestos fotoestables con alta capacidad insecticida, baja toxicidad para mamíferos y limitada persistencia en el ambiente (Davies *et al.*, 2007). La permetrina, la cipermetrina y la deltametrina fueron los primeros piretroides en presentar estas características (Davies *et al.*, 2007). Desde 1990, los compuestos piretroides utilizados como insecticidas para controlar Chagas fueron limitados a la cipermetrina y un grupo selecto de cianopiretroides de tercera generación como la deltametrina (Zerba, 1999; Mougabure-Cueto e Picollo, 2015). Actualmente, los piretroides utilizados son α -ciano-sustituidos y el modo de aplicación es como polvo humectable o concentrado, en una suspensión aplicable con mochilas de presión (Schofield e Dias, 1999)

Los proyectos de control de triatomíneos a gran escala comenzaron recién a principios de la década de 1960 con programas regulares nacionales y regionales contra el Chagas en Brasil, Argentina, Venezuela, Chile y Uruguay (Dias, 2007). En Argentina, la creación del Servicio Nacional de Chagas en 1962 estimuló la participación de las comunidades en el monitoreo y erradicación del vector en el ambiente domiciliario y peridomiciliario (Porcasi *et al.*, 2007). Doce países de América tienen programas de control activos que se basan en 3 etapas operativas: i) fase preparatoria o de mapeo y programación de las actividades basadas en los recursos, ii) fase de ataque y de rociado masivo de insecticidas en las casas, seguida de una segunda aplicación y iii) fase de vigilancia, en la cual se efectúa la detección de posibles focos de triatomíneos residuales. Esta última fase involucra la participación de las comunidades y actividades de control residual (Moncayo e Silveira, 2009; Mougabure-Cueto e Picollo, 2015).

Una de las acciones más importantes para reducir la transmisión de la enfermedad de Chagas fue la Iniciativa de los Países del Cono Sur (ICS), lanzada en el año 1991 por los gobiernos de Argentina, Paraguay, Uruguay, Brasil y Bolivia. Este consorcio internacional tenía como objetivos principales: i) la eliminación de la transmisión por donante de sangre mediante el control de las muestras, y ii) la eliminación de *T. infestans* mediante la aplicación de insecticidas con poder residual, el monitoreo de la reinfestación domiciliaria, y la participación de la comunidad y/o agentes de salud en las actividades

de control y vigilancia vectorial (Dias *et al.*, 2002; Schofield *et al.*, 2006). En un comienzo se consideró que era posible la eliminación de los vectores de Chagas, en base a dos supuestos que posteriormente probaron ser equivocados: 1) que el vector de la enfermedad se hallaba solo en el ambiente doméstico y peridoméstico, con la única excepción de focos silvestres en los valles andinos de Bolivia, y 2) que *T. infestans* era una especie con muy poca variabilidad genética, y por consiguiente tendría limitada probabilidad de desarrollar resistencia a insecticidas (Dias *et al.*, 2002; Schofield *et al.*, 2006).

En la misma línea de acción de la ICS, a nivel regional también se lanzó la Iniciativa de los países andinos (Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) en 1997, la Iniciativa de los países centroamericanos (Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Panamá) en 1997, y la Iniciativa de los países amazónicos (Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana Francesa, Perú, Surinam y Venezuela) en 2004. Por lo tanto, toda el área considerada endémica para la enfermedad de Chagas se cubrió con programas regionales de control intergubernamental, cuyos objetivos comunes eran la eliminación de todas las poblaciones de vectores en cada región, selección de donantes de sangre para reducir el riesgo de transmisión transfusional y detección de infección y tratamiento de recién nacidos infectados (Schofield *et al.*, 2006; Gürtler, 2009; Moncayo e Silveira, 2009). Estos programas de control redujeron el rango geográfico y la prevalencia de infestación de los principales vectores triatomíneos, lo que condujo a la interrupción de la transmisión mediada por *T. infestans* en amplias regiones de Sudamérica (Brasil, Chile, Uruguay y provincias / departamentos de Argentina, Paraguay, Bolivia y Perú), y disminución de la infestación por *T. dimidiata* y reducción importante de la distribución de *R. prolixus* en América Central (Schofield *et al.*, 2006; Gürtler *et al.*, 2009; Mougabure-Cueto e Picollo, 2015).

1.4 *Triatoma infestans*: principal vector de la enfermedad de Chagas en el Cono Sur.

En Sudamérica, el principal vector de Chagas es *T. infestans* (Klug, 1834). Este vector probablemente es originario de Bolivia, donde se encuentra en áreas domésticas, peridomésticas y silvestres. Desde allí se expandió hacia Argentina, Chile, Paraguay, Uruguay y Brasil, donde se volvió exclusivamente doméstico. A través de la Iniciativa del Cono Sur, *T. infestans* ha sido eliminada de Uruguay en 1997, de Chile en 1999 y de

Brasil en 2006, según la certificación de la Organización Panamericana de la Salud (Dias e Jemmio, 2008). La transmisión de *T. cruzi* por *T. infestans* también se interrumpió en cinco provincias de Argentina y el este de Paraguay (Dias *et al.*, 2008). En Brasil, todavía hay focos residuales en los estados de Rio Grande do Sul (RS) y Bahia (BA). En Bolivia, donde la especie aún se encuentra ampliamente diseminada, se ha informado de ocurrencias a altitudes de 3,600 m; la especie continúa transmitiendo *T. cruzi* en los valles andinos de Bolivia y en el Gran Chaco.

La alta variabilidad genética de *T. infestans* encontrada en una escala microgeográfica entre vectores silvestres en los valles andinos de Bolivia favorece la hipótesis de que los Andes fueron el centro original de dispersión de *T. infestans* (Noireau, 2009). A pesar del éxito en el control de poblaciones de *T. infestans* en distintas áreas del Cono Sur, continúan existiendo fallas en la ecoregión del Gran Chaco (Gürtler *et al.*, 2007). Se trata de una llanura semiárida de 1,1 millones de Km² que cubre gran parte del norte y el centro de Argentina, el sudeste de Bolivia, el centro y el oeste de Paraguay, donde la enfermedad de Chagas es hiperendémica.

La falla en la eliminación de *T. infestans* del Gran Chaco, incluso en áreas que experimentaron un intenso esfuerzo para controlarlo, indica la necesidad de una coordinación sostenida y continua entre los gobiernos y las agencias, con programas de control que adoptan nuevas estrategias (Gürtler, 2009). La Iniciativa del Cono Sur ha establecido como una de sus prioridades la de establecer las causas de la persistencia de *T. infestans* en la ecoregión del Gran Chaco (Dias, 2007). La alta resistencia a piretroides que se ha reportado en poblaciones de vectores de Chagas en esta región es probablemente una causa importante de las fallas en el control.

1.5 Resistencia a insecticidas.

El fenómeno de resistencia es definido como la capacidad de una población de insectos de tolerar una dosis de un insecticida que sería letal para la mayoría de los individuos en una población sensible de la misma especie (Brown, 1958). Es el resultado de la presión de selección positiva ejercida por el insecticida sobre polimorfismos genéticos que estaban presentes inicialmente en baja frecuencia. Los polimorfismos asociados a resistencia pueden luego dispersarse; el patrón de distribución de estas variantes genéticas en poblaciones naturales será el efecto conjunto de fuerzas evolutivas y factores demográficos como la selección, mutación y el ciclo de vida (Ffrench-Constant,

2013). También se describe como: ‘un cambio heredable en la sensibilidad de una población plaga que se refleja en repetidos fallos de un producto para alcanzar los niveles de control esperados al ser usado de acuerdo con las recomendaciones de la etiqueta para esa plaga’ (IRAC).

Se ha propuesto que la resistencia a los insecticidas es un fenómeno de preadaptación, en el sentido de que antes de la exposición a un agente estresante (en este caso, la exposición a un insecticida), ya existen individuos que portan una o más mutaciones de resistencia (tales como polimorfismos en la secuencia o aumento en la expresión de un determinado gen), que le permiten sobrevivir a la exposición a ese agente estresante (Casida, 1980). Frente a un tratamiento con insecticidas, la descendencia de los individuos resistentes tendrá una mayor tasa de supervivencia, y eventualmente prevalecerá en la población. El surgimiento de resistencia representa un obstáculo en la lucha contra las enfermedades transmitidas por insectos. Diversos factores contribuyen al surgimiento de resistencia a insecticidas (Georghiou y Taylor, 1977; Georghiou, 2012)

- a) *Factores genéticos*: frecuencia y número de mutaciones de resistencia, interacción entre alelos, penetrancia, expresividad, selección, etc.
- b) *Factores biológicos*: generaciones, prole por generación, migración, etc.
- c) *Factores operacionales*: - Químicos: tipo de insecticida usado, relación con otros insecticidas usados previamente, residualidad, etc. - Aplicaciones: umbral de aplicaciones, modo de aplicación, selección de alternativas, etc (Georghiou, 2012).

El surgimiento de resistencia ocasiona la reducción de opciones disponibles para el control de insectos plaga, y plantea la necesidad de buscar métodos que complementen o reemplacen los insecticidas neurotóxicos utilizados hasta el momento. El tiempo, el esfuerzo y los costos implicados en el descubrimiento y desarrollo de nuevos insecticidas son limitantes en el desarrollo de nuevos productos. Por otro lado, es importante minimizar las posibilidades de desarrollo de resistencia para productos existentes, ya que en muchos casos pueden no estar disponibles compuestos alternativos. El monitoreo y manejo de la resistencia son de suma importancia, y una preocupación fundamental para todos los agentes involucrados en el control de insectos perjudiciales. Una de las claves para abordar los problemas de resistencia a los insecticidas es la capacidad de detectar con fiabilidad la presencia de

insectos resistentes a través de métodos de diagnóstico sencillos y reproducibles (Sparks e Nauen, 2015).

1.6 Mecanismos de resistencia a insecticidas neurotóxicos.

Se han descrito distintos mecanismos de resistencia a insecticidas, los cuales pueden clasificarse según cambios cualitativos o cuantitativos en el individuo.

1.6.1 Detoxificación metabólica de insecticidas neurotóxicos

En insectos, los mecanismos de biotransformación (de moléculas tóxicas a no tóxicas) involucran reacciones de Fase I y Fase II. La Fase I incluye oxidación, reducción e hidrólisis, y está involucrada en la detoxificación de xenobióticos. Participan las monooxigenas del citocromo P450. La Fase II es un proceso de síntesis en la que las enzimas de conjugación se unen a las toxinas o los productos primarios de la Fase I, y los convierten en derivados solubles en agua para su posterior excreción. Intervienen las Glutación transferasas (GSTs), que catalizan el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico glutación reducido (o GSH) sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas. El surgimiento de resistencia asociado a enzimas detoxificativas involucra un aumento en el número de copias, y/o mutaciones de la secuencia codificante. Una característica significativa de los insectos resistentes es el aumento de los niveles de expresión de P450s, GSTs y CCE lo que resulta en un aumento de los niveles de producción de proteínas y actividades enzimáticas. Ésta a su vez mejora la desintoxicación de los insecticidas y toxinas vegetales, y conduce a el desarrollo de la resistencia a los insecticidas y/ o la tolerancia a las toxinas vegetales.

- Las **citocromo P450 (P450s / CYPs, pigmento con absorción a 450 nm)** son una de las familias de genes más grandes en todos los organismos vivos. Son enzimas que cumplen un grupo muy diverso de funciones fisiológicas y bioquímicas. Resultan esenciales para la desintoxicación de xenobióticos y compuestos endógenos (Claudianos *et al.*, 2006). Hasta ahora, se han descripto alrededor de 59 familias CYP entre 89 especies de insectos. Estos CYP se distribuyen entre cuatro clados: CYP2, CYP3, CYP4 y mitocondrial; cada uno con varias subclasificaciones en familias y subfamilias (Aguiar *et al.*, 2005). Son

enzimas inespecíficas y catalizan una reacción de oxidación dependiente de NADPH, de la flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa, de un ferro proteína y del citocromo P450 (Oppenoorth, 1985). Los metabolitos polares producidos por este mecanismo son a veces más tóxicos que los compuestos que le dieron origen. Las epoxidaciones casi siempre producen metabolitos más tóxicos, mientras que las desulfuraciones oxidativas de organofosforados siempre los producen (Bend, 1982). Este es uno de los mecanismos más importantes en la detoxificación de los insecticidas debido fundamentalmente a la falta de especificidad, localización estratégica, inducibilidad y sincronización que han desarrollado los insectos (Saume, 1992). Miembros de los clados CYP4, CYP6, CYP9 y CYP12 juegan un papel vital en el metabolismo de los xenobióticos en insectos y estarían involucradas en la resistencia a insecticidas (Aguiar *et al.*, 2005; Feyereisen, 2012). González Audino *et al.* (2004) y Picollo *et al.* (2005) midieron la actividad del citocromo P450 en individuos de *T. infestans* a través de actividad de etoxicumarina-deetilasa (ECOD) (González Audino *et al.*, 2004; Picollo *et al.*, 2005). La actividad ECOD fue significativamente mayor en una colonia resistente a deltametrina que en una colonia susceptible. Estos resultados sugieren que los citocromos P450 juegan un papel importante en la resistencia a la deltametrina. Por otra parte, se ha confirmado recientemente la sobreexpresión de genes CYP4 en poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides; sugiriendo que esta familia estaría involucrada en el mecanismo de desintoxicación en esta especie (Grosso *et al.*, 2016; Traverso *et al.*, 2017). También, se ha reportado la sobreexpresión de 4 genes CYP del clado 3 (JAS02907, JAR98720, JAS02911, JAR98721) (entre 1, 7 a 3, 8 sobreexpresados) y de un gen CYP del clado 4 (1,5 veces sobreexpresado) *T. infestans* resistentes (Calderón-Fernández *et al.*, 2017).

- Las **glutación transferasas (GST)** son proteínas diméricas solubles que están implicadas en el metabolismo, la desintoxicación y la excreción de un gran número de compuestos endógenos y exógenos (Wilce e Parker; 1994). Poseen un amplio rango de sustratos específicos, incluyendo sustratos endógenos, tales como carbonilos insaturados, aldehídos electrofílicos, epóxidos e hidroperóxidos orgánicos producidos como producto de la ruptura de macromoléculas durante el período de estrés oxidativo (Vontas *et al.*, 2002). Estas enzimas están involucradas en la O-dealquilación u O-dearilación de insecticidas organofosforados (Vontas

et al., 2002), como un mecanismo secundario de detoxificación y en la dehidroclorinación de insecticidas organoclorados (Hemingway *et al.*, 1999).

Con dependencia de su ubicación en la célula, las GST de insectos se clasifican en microsomales o citosólicas. Además, se las clasifica en las clases Delta, Epsilon, Sigma, Theta, Omega, y Zeta. Las clases Delta y Epsilon son exclusivas de insectos, y son las principales clases de GST que han sido implicadas en la resistencia a los insecticidas. Se ha reportado que las GST confieren resistencia a piretroides ya que actúan sobre los lípidos productos de la peroxidación inducida por los piretroides, de esta forma protegen los tejidos del daño oxidativo (Vontas *et al.*, 2002) y/o uniéndose a las moléculas del piretroide en un mecanismo de secuestro (Kostaropoulos *et al.*, 2001). El primer gen de una GST identificado en insectos fue clonado en *Nilaparvata lugens* (Hemiptera); se demostró que este gen estaba involucrado en la resistencia a piretroides (Vontas *et al.*, 2002) (Aravindan *et al.*, 2014). Los triatomíneos presentan una reducción en la representatividad de las GST de la clase Delta con respecto a otros insectos, mientras que ningún miembro de la clase Epsilon fue identificado (Traverso *et al.*, 2017). En cuanto a la clase Sigma, se encontró una mayor representación en triatomíneos con respecto a otros insectos. Esto podría reflejar un papel frente al estrés oxidativo inherente a la alimentación con sangre (Traverso *et al.*, 2017).

- Las **carboxilesterasas (CCE)** son proteínas multifuncionales involucradas en la degradación de los insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides. Están implicadas en la hidrólisis de ésteres carboxílicos a alcoholes y ácidos. Su clasificación se hace muy dificultosa debido a su especificidad de sustrato superpuesto. Oakeshott *et al.* (2015) proponen una clasificación basándose en 35 secuencias de *D. melanogaster*, 51 secuencias *An. gambiae* y otras 35 secuencias para describir las esterasas de insectos (Oakeshott, 2015). Se pueden dividir en 14 clados principales (A a N), clasificados en tres grandes grupos:
 - *Dietarias* (grupo A-C): metabolizan una amplia gama de sustratos incluyendo insecticidas y xenobióticos de la dieta
 - *Degradativas de hormonas y feromonas* (grupo D-H): esterasas de hormonas juveniles y las carboxilesterasas degradativas de feromonas

- *De neurodesarrollo* (grupo I-N): contiene proteínas implicadas en funciones de neurodesarrollo como las acetilcolinesterasas (AChEs), neuroliginas, neurotactinas, gliotactinas y otras (Oakeshott, 2015).

Se han reportado cambios cualitativos en las propiedades enzimáticas debido a mutaciones en secuencias específicas que codifican esterasas, lo que resulta en una actividad disminuida OP hidrolasa. Han sido documentados cambios cualitativos en los dípteros resistentes *Culex tarsalis*, *Chrysomya putoria*, *Musca domestica*, en el himenóptero, *Anisopteromalus calandrae*, y en el lepidóptero, *Plodia interpunctella*. Los cambios cuantitativos asociados a amplificaciones de genes de esterasa específicos se han encontrado en al menos dos órdenes, incluidos Hemiptera (*Myzus persicae*, *Schizaphis graminum* y *N. lugens*) y Diptera (complejo de *Culex pipiens* y *C. tritaeniorhynchus*). La regulación positiva de los genes de esterasas ha sido implicada en los mecanismos de resistencia de las especies en los órdenes Hemiptera (*Lygus lineolaris*, pulgón verde del durazno, *M. persicae*), Hymenoptera (avispa parasitoide *Habrobracon hebetor*), Lepidoptera (el barrenador asiático del arroz, *Chilo suppressalis*), y Diptera (la mosca de los cuernos, *Haematobia irritans* (L.) y *Culex pipiens*). En *T. infestans* se ha reportado la sobreexpresión (2,5 veces superior) de un gen CCE en insectos resistentes (Calderón-Fernández *et al.*, 2017). Un análisis genómico y transcriptómico recientemente realizado en nuestro grupo de trabajo ha reportado que en los insectos triatominos estudiados (*T. dimidiata*, *T. infestans*, *Triatoma pallidipennis* y *R. prolixus*) la clase dietaria de CCE se encuentra ausente o muy disminuida con respecto a otras especies (Traverso *et al.*, 2017), lo cual sugiere un menor potencial de esta clase de enzimas para la desintoxicación de insecticidas. Sin embargo, otros estudios han demostrado la actividad de las CCE en la degradación de piretroides en *T. infestans*. Por lo tanto, es factible que en esta actividad estén implicadas las CCE de clase II, tal como ha sido reportado para otras especies (Claudianos *et al.*, 2006; Oakeshott, 2015). En cuanto a la clase de CCEs degradativas de hormonas y feromonas, se encontró que los triatominos estudiados presentaban expandida la Clase E (Traverso *et al.*, 2017).

1.6.2 Aumento del grosor cuticular y disminución de la penetración cuticular.

Se han reportado modificaciones en la cutícula del insecto o en los revestimientos del tracto digestivo que previenen o frenan la absorción o penetración de los insecticidas

en algunas poblaciones de insectos resistentes (Scott *et al.*, 1991). Este mecanismo no es específico para un determinado compuesto, y puede afectar a una amplia gama de insecticidas. La reducción de la captación de insecticida, denominada resistencia cuticular, se ha descrito como un mecanismo de resistencia menor o contributivo. Ciertamente, para las plagas en las que la vía principal de suministro de insecticida es a través de la ingestión, es probable que así sea. Sin embargo, para el control de insectos donde los insecticidas se absorben principalmente a través de los apéndices, un aumento en el espesor de la cutícula tarsal o una reducción en la permeabilidad a los insecticidas lipófilos podría tener un impacto importante sobre la biodisponibilidad. En triatominos se ha observado un aumento significativo en la composición de hidrocarburos cuticulares y un engrosamiento de la cutícula en insectos resistentes en relación a susceptibles a piretroides (Pedrini *et al.*, 2009). Ambos, engrosamiento de la cutícula y penetración de insecticida reducida también se observaron en otras especies de insectos (Balabanidou *et al.*; Koganemaru *et al.*, 2013). Además, un gran número de proteínas de la cutícula están sobreexpresadas en insectos resistentes a los piretroides (Koganemaru *et al.*, 2013). Recientemente, a través de estudios de transcriptómica y expresión diferencial, se reportó la sobreexpresión de dos genes de proteínas estructurales de cutícula en *T. infestans* resistentes (5, 2 y 27, 7 veces mayor) (Calderón-Fernández *et al.*, 2017).

En relación a la penetración de la deltametrina, se ha estudiado la cantidad interna del insecticida entre cepas resistentes y susceptibles después de los ensayos de topicación. Se encontró que la cantidad de la deltametrina en una cepa susceptible era dos veces superior a la detectada en individuos resistentes (Pedrini *et al.*, 2007).

1.6.3 Modificaciones asociadas al comportamiento.

Se define como la capacidad de sobrevivir a las aplicaciones de insecticidas a través de modificaciones en el comportamiento. No es tan frecuente como la resistencia asociada a otros aspectos de la fisiología del insecto. Se han reportados casos en un amplio rango de grupos taxonómicos tales como Coleoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Hemiptera y Diptera (Mamidala *et al.*, 2011). Se ha demostrado, por ejemplo, que chinches de la especie *Cimex lectularius* evitan quedarse sobre papel de filtro tratado con deltametrina, un tipo de resistencia de comportamiento en el que el insecto se mantiene apartado del insecticida. Según lo reportado, los insectos aumentaron la actividad cuando contactaron dosis subletales de deltametrina (Romero *et al.*, 2009). En ninfas en tercer estadio de *T.*

infestans se observó que luego de la exposición a deltametrina o cipermetrina, se produjo hiperactividad relacionada a un aumento en la actividad locomotora a temperaturas entre un rango de 26 a 36° C (Alzogaray *et al.*, 1997). De cualquier manera, el efecto observado puede ser producto de la sobreestimulación de la deltametrina sobre el canal de sodio dependiente de voltaje, su proteína blanco.

1.6.4 Insensibilidad al sitio blanco.

La insensibilidad al sitio blanco resulta de la modificación estructural o mutación de genes que codifican proteínas que son blanco de insecticidas (Casida e Durkin, 2013). El uso constante y extensivo de insecticidas químicos ha creado una presión de selección a favor del desarrollo de resistencia en muchas especies de insectos en todo el mundo. Uno de los más importantes mecanismos de resistencia a los piretroides se clasifica como insensibilidad del sitio blanco, debido a cambios conformacionales que perjudican una unión apropiada de la molécula insecticida.

1.7 Canal de sodio dependiente de voltaje como sitio de acción de los piretroides.

El sitio principal de acción de los insecticidas piretroides es el canal proteico de sodio dependiente de voltaje, presente en la membrana de las células excitables, aunque existen reportes que sugieren sitios secundarios de acción (tales como la ATPasa mitocondrial dependiente de magnesio, canales de potasio retrasados, canales de calcio de tipos T ('T' por "transitorios") y L ('L' por "larga" duración), entre otros) (Raymond-Delpech *et al.*, 2005).

Los canales de sodio dependientes de voltaje son miembros de la superfamilia de los canales iónicos, que incluye canales de transporte de potasio, de calcio, canales asociados a Trp (permeable a varios tipos de cationes) y canales asociados a nucleótidos cíclicos (Yu e Pomès, 2003). Son proteínas integrales de membrana cuya estructura fue ampliamente descrita en mamíferos (Catterall, 2000; Yu e Pomès, 2003). Su función es mediar la entrada transitoria de Na⁺ durante el potencial de acción, extendiéndose a través de los axones y dendritas de las neuronas y las células eléctricamente excitables (Raymond-Delpech *et al.*, 2005).

A fines de 1980 se clonaron en *Drosophila melanogaster* dos posibles genes ortólogos del canal de sodio dependiente de voltaje de mamíferos: *DSC1* y *para* (Raymond-Delpech *et al.*, 2005). La estructura general y la secuencia de aminoácidos del canal de sodio de insectos comparten una alta similitud con la subunidad α del canal de sodio de mamíferos. Las características estructurales están altamente conservadas, y son críticas para la función (Raymond-Delpech *et al.*, 2005).

El canal de sodio consta de cuatro dominios. Cada dominio contiene seis segmentos transmembrana (S1-S6) unidos por *loops* intra o extracelulares. El segmento S4 presenta un alto grado de conservación y está asociado a la actividad sensora de voltaje. Contiene de cuatro a ocho residuos cargados positivamente (Arg o Lys), lo que le confiere la capacidad de ser anfifílico (moléculas que tienen una cabeza polar unida a una larga cola hidrófoba) (Raymond-Delpech *et al.*, 2005). El motivo hidrófobo 'IFM' (Ile-Phe-Met en vertebrados) o 'MFM' (Met-Phe-Met en insectos) en la conexión entre los dominios III y IV sirve como una compuerta de inactivación y es importante para causar la inactivación rápida. Varios residuos en el bucle intracelular conectan S4 y S5 (es decir, IIS4-S5 y IVS4-S5) (Dong, 2007). Los segmentos S5 y S6 forman un poro central conductor de iones (Catterall, 2000).

El canal de sodio es responsable de la entrada masiva de sodio a la célula durante el potencial de acción, y es por lo tanto fundamental para la señalización eléctrica en las células excitables. El funcionamiento de los canales de sodio implica:

- activación dependiente de voltaje
- conducción selectiva de iones
- inactivación (Catterall, 2000).

En el estado de reposo, el canal está cerrado ya que la compuerta *m* bloquea el poro. Cuando ocurre un cambio en el potencial de membrana (despolarización), los sensores de potencial en el segmento S4 comienzan a moverse. Una vez que los 4 segmentos S4 de cada uno de los dominios se encuentran en la posición activada, el canal se abre. La apertura es de corta duración y permite el ingreso masivo de iones Na^+ . El proceso de inactivación consiste en la oclusión del poro en la cara intracelular mediado por la partícula en la compuerta *h* (el segmento aminoacídico de unión entre los dominios III y IV): inactivación rápida (Yu e Pomès, 2003). En este estado, el canal permanece abierto, pero se encuentra en una fase de no conducción iónica. La compuerta *h* continúa bloqueando el poro, pero dentro de un período refractario (de 2 - 5 ms). La remoción de

la inactivación ocurre una vez que la membrana se repolariza y la partícula de inactivación vuelve a su posición original (Davies *et al.*, 2007).

Los canales de sodio dependientes de voltaje son el blanco de acción de DDT y piretroides. Estos insecticidas actúan sobre el sistema nervioso del insecto causando una alteración del potencial de acción, provocando la iniciación de descargas repetitivas en los axones motores y sensoriales (Soderlund e Bloomquist; 1989). La insensibilidad en el sitio blanco se caracteriza por una reducción en la sensibilidad, asociada a modificaciones en la estructura del canal (Lee *et al.*, 1999). Los primeros estudios con poblaciones de insectos revelaron que individuos resistentes al DDT exhibían resistencia cruzada frente piretroides, y que este fenómeno se asociaba a la desensibilización del sistema nervioso (Lee *et al.*, 1999).

Se ha propuesto un modelo tridimensional para el canal de sodio dependiente de voltaje en el insecto *Musca domestica*, desarrollado a fin de predecir posibles sitios de unión de insecticidas (O'reilly *et al.*, 2006). Según el modelo, el sitio de unión de insecticidas está formado principalmente por residuos del dominio II del canal, en asociación con elementos adyacentes pertenecientes a los dominios IS6 y IIS6. El sitio de unión estaría delimitado por el linker S4-S5 del dominio II y los segmentos IIS5 y IIS6, que formarían una cavidad hidrofóbica. En el estado abierto, esta cavidad sería accesible a la bicapa lipídica y por lo tanto a los insecticidas liposolubles. Las uniones formadas estabilizarán la conformación abierta del canal; la selectividad de los insecticidas estaría asociada a residuos aminoacídicos no conservados entre artrópodos y no artrópodos, como por ejemplo Ile 936, Cys 933 y Phe 1530 (por convención, los números hacen referencia a las posiciones aminoacídicas del canal de sodio de *M. doméstica*) (O'reilly *et al.*, 2006). Según el modelo propuesto, los residuos Met918, Thr929, Leu925 y Leu932 son sitios de contacto con el piretroide fenvalerato. Estos resultados son complementarios a experimentos electrofisiológicos realizados en ovocitos de *Xenopus leavis* que expresaban distintas variantes del canal de sodio (O'reilly *et al.*, 2006).

James Ronald Busvine describió en el año 1951 la resistencia “*knockdown*” en *M. domestica* (Soderlund e Knipple, 2003; Soderlund, 2008). La misma se encuentra asociada a resistencia al efecto de parálisis y volteo (*knockdown*) exhibido en insectos luego de la exposición al DDT, análogos del DDT y piretroides. Tras varios estudios posteriores se aisló el alelo de la resistencia *kdr*, un carácter recesivo localizado en el cromosoma 3 de la mosca. En 1965, Tsukamoto *et al.* proporcionaron la evidencia

experimental de que *kdr* reducía la sensibilidad al DDT a nivel del sistema nervioso central. Se conoce como *kdr* (*knockdown resistance*) a la reducción en la sensibilidad a piretroides causada por mutaciones puntuales en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje. La gran mayoría de las mutaciones correlacionadas con resistencia a piretroides se encuentra en el dominio II de esta proteína. El mecanismo de resistencia tipo *kdr* ha sido descrito en numerosas especies de insectos de interés económico y sanitario (Soderlund, 2008).

La investigación con poblaciones europeas de *M. domestica* que exhibían altos niveles de resistencia a piretroides llevó al aislamiento de dos nuevos alelos asociados a la resistencia de tipo *knockdown*, designados: *super-kdr_{A2}* y *super-kdr_{3D}*. Los mismos fueron aislados y mapeados en el cromosoma 3. En contraste con el alelo *kdr*, que confiere niveles similares de resistencia a DDT y una amplia variedad de piretroides, el grado de resistencia proporcionado por los alelos *super-kdr* es ampliamente variable (desde cuatro veces a más de 300 veces superiores a la referencia), dependiendo del compuesto evaluado. Ambos rasgos *super-kdr* confieren niveles particularmente altos de resistencia a los piretroides potentes tales como deltametrina, cipermetrina y fenvalerato que contiene el grupo funcional α -ciano-3-fenoxibencilo alcohol. Se encontró que el alelo *super-kdr_{A2}* proporcionaba un aumento moderado en la resistencia a bioresmetrina y cismetrina en comparación con *kdr*, mientras que las moscas que portaban el alelo *super-kdr_{3D}* eran sustancialmente más resistente a estos compuestos (Soderlund e Bloomquist, 1989).

Cabe destacar que el factor *kdr* confiere un nivel de resistencia uniforme en un amplio rango de estructuras y toxicidades de los piretroides, lo que indica que la mutación no es sensible a variaciones en la molécula del piretroide. La mutación *super-kdr* es altamente sensible a la estructura, observándose los mayores niveles de resistencia frente a los piretroides de tipo II (Soderlund, 2008).

Debido a que el canal de sodio es el sitio blanco del DDT y piretroides, muchos estudios entre las décadas de los 80 y 90s se enfocaron en esta proteína. La mutación de tipo *kdr* más habitual en poblaciones resistentes, y la primera descrita en insectos, es la sustitución aminoacídica de un residuo Leu por Fen en la posición 1014 (L1014F) (por convención los números hacen referencia a las posiciones en el canal de *M. domestica*) en el segmento S6 del dominio II del canal de sodio. La mutación L1014F suele conferir un nivel de resistencia moderado a DDT y piretroides (10 a 30 veces superior a la referencia) (Martínez-Torres *et al.*; 1997). En trabajos de nuestro laboratorio se ha

reportado la presencia de la mutación L1014F en el canal de sodio dependiente de voltaje en poblaciones resistentes de *T. infestans* (Fabro *et al.*, 2012; Sierra y Capriotti., 2016).

Estudios posteriores al hallazgo de la mutación L1014F han detectado alrededor de 50 polimorfismos en la secuencia aminoacídica del canal de sodio asociados con el fenómeno de resistencia en distintas especies de insectos (Dong *et al.*; 2014). Han sido reportadas como mutaciones únicas en poblaciones resistentes: V410M, M918V, L1014 (sustituida por F, H o S), F1538I y L925I.

Por otra parte, se ha descripto para numerosas especies, la presencia de una mutación adicional de Met a Thr en la posición 918 (M918T), asociada al fenotipo *super-kdr* de muy alta resistencia. La misma ocurre en el linker S4-S5 del dominio II. Este fenotipo se asocia a niveles elevados de resistencia a piretroides (más de 500 veces superior) (Soderlund, 2008; Dong *et al.*, 2014).

En el año 2002 se identificó la mutación L925I en *Bemisia tabaci*, vinculada estrechamente a resistencia a insecticidas piretroides (Morin *et al.*, 2002; Alon *et al.*, 2006; Reditakis *et al.*, 2017). La misma mutación fue hallada en la chinche *Cimex lectularius* (Yoon *et al.*, 2008), la garrapata *Rhipicephalus microplus* (Morgan *et al.*, 2009), la mosca *Trialeurodes vaporariorum* (Karatolos *et al.*, 2012), el crustáceo *Hyaella azteca* (Weston *et al.*, 2013) y el acaro *Varroa destructor* (González-Cabrera *et al.*, 2016). En estudios previos de nuestro grupo de trabajo, fue detectada la mutación L925I en poblaciones resistentes de *T. infestans* de la localidad El Malá (Chaco, Argentina) (Capriotti *et al.*, 2014).

La mutación L925I se encuentra en el *loop* intracelular entre IIS4 y IIS5 (O'reilly *et al.*, 2006). Se sabe que el residuo L925 corresponde a uno de los cuatro residuos involucrados en el modelo de interacción piretroide - canal propuesto por O'Reilly y es un residuo altamente conservado (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2016). Se propone que el residuo L925 hace contacto con el grupo alcohol del piretroide; un cambio en la cadena lateral de la secuencia aminoacídica sería suficiente para alterar la forma de la cavidad hidrofóbica afectando la unión del piretroide. A través de estudios funcionales de electrofisiología en ovocitos de *X. laevis* se determinó que L925I tiene una influencia significativa en la unión de los piretroides al canal de sodio, al conferir insensibilidad a los piretroides e influir negativamente en la efectividad de los mismos. La mutación L925I afectó la efectividad de deltametrina y permetrina (50 y 32 veces menor potencia de acción, respectivamente) (Usherwood *et al.*, 2007).

En la **Figura 1.3** se esquematizan la gran mayoría de las mutaciones asociadas a resistencia en el dominio II del canal de sodio dependiente de voltaje y en la **Tabla 1.1** se muestran las mutaciones de tipo *kdr* descriptas para especies de insectos perjudiciales de nuestro país (muchas de estas mutaciones han sido reportadas en poblaciones de otros países, no estudiadas hasta el momento en Argentina).

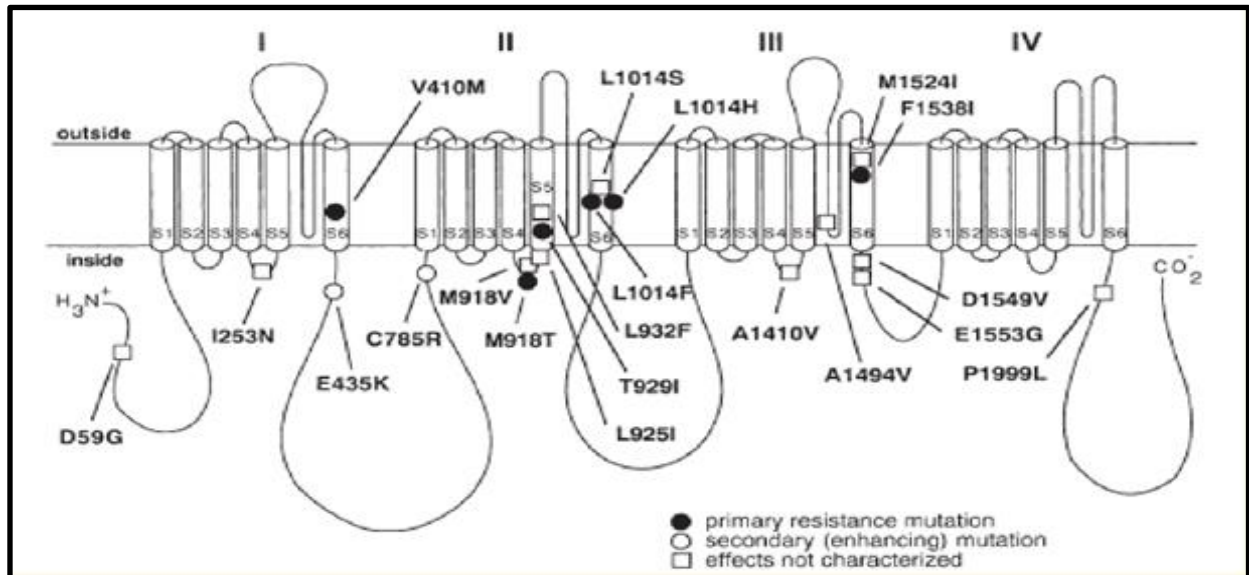


Figura 1.3: Representación esquemática de la estructura del canal de sodio dependiente de voltaje y mutaciones asociadas con la resistencia *kdr*.

Diagrama de la estructura transmembrana de las subunidades α del canal de sodio dependiente de voltaje, donde se muestran los cuatro dominios homólogos internos (I-IV), cada uno con seis hélices transmembrana (S1-S6). Los segmentos 5 y 6 forman el poro conductor de iones y las hélices S4 constituyen los sensores de voltaje. Imagen extraída de Soderlund, 2003.

Tabla 1. 1: Especies plaga de Argentina con sustituciones de resistencia a insecticidas (<i>kdr</i>) identificadas.			
Especie	Nombre común	Efectos perjudiciales	Sustituciones <i>kdr</i> reportadas
<i>Aedes aegypti</i>	Mosquito Aedes	Vector de dengue	L1011M, L1011V, V1016G, S989P, D1763Y, V1016I, F1534C
<i>Aphis gossypii</i>	Pulgón	Plaga de cultivos	M918T, M918L, L1014F
<i>Blattella germanica</i>	Cucaracha	Transmisión de enfermedades	L1014F, F1020S
<i>Bemisia tabaci</i>	Mosca blanca	Plaga de cultivos	M918V, L925I
<i>Cimex lectularius</i>	Chinche de la cama	Urticaria, alergias	L925I
<i>Culex pipiens</i>	Mosquito	Urticaria, transmisión de enfermedades	L1014F
<i>Ctenocephalides felis</i>	Pulga	Urticaria en animales domésticos y humanos	T929V, L1014F
<i>Cydia pomonella</i>	Carpocapsa	Plaga de frutales	L1014F
<i>Frankliniella occidentalis</i>	Trips de las flores	Plaga de agricultura	T929I, L1014F
<i>Haematobia irritans</i>	Mosca de los cuernos	Daños económicos en la ganadería	L1014F
<i>Helicoverpa armigera</i>	Oruga	Plaga de los cultivos	D1549V, E1553G
<i>Helicoverpa zea</i>	Barrenador del tallo	Plaga de maíz	V410M, V410A, V410G, L1014H
<i>Heliothis virescens</i>	Gusano cogollero	Plaga de los cultivos	V410M
<i>Myzus persicae</i>	Pulgón verde	Plaga de cultivos	M918T, L1014F
<i>Pediculus humanus capitis</i>	Piojo de la cabeza	Urticaria	M815I, T917I, L920F, T921I, L1014F, G943A
<i>Plutella xylostella</i>	Polilla de coles	Plaga de cultivos	T929I, L1014F, A1101T, P1879S, M918I
<i>Sitobion avenae</i>	Pulgón de trigo	Plaga de cultivos	L1014F
<i>Sitophilus zeamais</i>	Gorgojo de maíz	Plaga de cultivos	T929I
<i>Stomoxys calcitrans</i>	Mosca brava	Daños económicos en la ganadería	L1014C
<i>Thrips tabaci</i>	Trips de cebolla	Plaga de cultivos	M918T, L1014F, M918L, V1010A
<i>Trioulordes vaporarium</i>	Mosca blanca de invernaderos	Plaga de cultivos	M918L, V1010A, T929I
<i>Triatoma infestans</i>	Vinchuca	Transmisión de la enfermedad de Chagas	L1014F, L925I
<i>Tuta absoluta</i>	Polilla del tomate	Plaga de cultivos	M918T, L1014F, T929I

Fuente: Capriotti et al., 2014, Dong et al., 2014, Fabro et al., 2012, Morin et al., 2002.

1.8 Resistencia a insecticidas en triatominos.

Los primeros estudios realizados durante 1990 en búsqueda de posibles focos de resistencia a deltametrina en poblaciones de *T. infestans* en Argentina y Brasil mostraron niveles nulos o muy bajos de resistencia (Zerba, 1999). El primer reporte de poblaciones de *T. infestans* con alta resistencia a deltametrina data del año 2005 (Picollo et al., 2005), y coincide con fallas en las campañas de control. En ese primer trabajo se realizaron estudios toxicológicos en 4 poblaciones provenientes de distintas localidades de la Provincia de Salta, los cuales evidenciaron tasas de resistencia (RR) muy elevadas para piretroides. Las RR reportadas para deltametrina fueron desde 50,5 (El Sauzal) hasta 133.1 Salvador Mazza), mientras que para otros piretroides fueron aún mayores (Picollo

et al., 2005). El mismo tipo de estudios realizados hasta el año 1999 no daban cuenta de posibles focos de resistencia en esa zona (Picollo *et al.*, 2005). Sumado a estos resultados, se detectaron fallas en la eliminación de triatominos luego de la aplicación de deltametrina y otros piretroides por parte de las autoridades del Programa Nacional de Control de Vectores en las mismas zonas.

Los niveles moderados de resistencia a deltametrina en vectores de la enfermedad de Chagas fueron asociados con un aumento del metabolismo oxidativo, y con un aumento de la actividad de esterasas y monooxigenasas (Santo Orihuela *et al.*, 2008). Los resultados indicaron por otra parte una alta actividad de la monooxigenasa P450 en poblaciones resistentes (Santo Orihuela *et al.*, 2008). Por otra parte, es interesante remarcar que en algunas poblaciones se han observado diferencias en los perfiles de resistencia a piretroides entre huevos y ninfas de primer estadio; huevos provenientes de las poblaciones de Mataral, Sucre y Yacuiba (Bolivia) presentan susceptibilidad a deltametrina, mientras que las ninfas de primer estadio de las mismas poblaciones demuestran altos niveles de resistencia en los ensayos (Tolozza *et al.*, 2008). Más tarde, Germano *et al.* (2010) estudiaron varias localidades de Argentina y Bolivia; reportando resistencia en poblaciones de *T. infestans* hacia el norte y hacia el sur de la frontera argentino-boliviana con RR de 500 (Germano, Roca Acevedo, *et al.*, 2010). Esto indicó la presencia de un área de extensión mayor a la esperada. Del mismo modo, Lardeux *et al.* (2010) encontraron que el 28% de las poblaciones fueron susceptibles en Bolivia y propusieron que la resistencia a la deltametrina se extendió por todo ese país, con niveles de resistencia que van desde 6 hasta 49 (Lardeux *et al.*, 2010). Germano *et al.* (2012) y Roca-Acevedo *et al.* (2013) reportaron resistencia a deltametrina en Acambuco (RR=32.5) y Campo Largo (RR=1108) (Salta) (Germano *et al.*, 2012; Roca-Acevedo *et al.*, 2013). En la localidad de Madrejones, Provincia de Salta, se encontraron *T. infestans* con moderados niveles de resistencia, (LD50) 35,7 veces superior a la de una población susceptible (Fabro *et al.*, 2012). Con posterioridad, fueron detectados altos niveles de resistencia a deltametrina en poblaciones de *T. infestans* colectadas en la Provincia argentina de Chaco; en las localidades de El Malá (RR > 1030) (Carvajal *et al.*, 2012), La Esperanza (RR > 200) (Germano *et al.*, 2013; Germano *et al.*, 2014), El Juramento (RR > 2000) (Sierra y Capriotti., 2016), Pampa Argentina, Campo Alto, El Asustado y La Rinconada (todas RR>1000) (Fronza *et al.*, 2016).

Desde el punto de vista genético se sabe que la resistencia está asociada a factores de herencia semidominante y se ha sugerido la existencia de más de un gen

relacionado con la resistencia a insecticidas (Germano, Vassena, *et al.*, 2010). Es sabido que el canal de sodio dependiente de voltaje de los insectos es sitio de ocurrencia de numerosas mutaciones relacionadas a resistencia a piretroides (Soderlund, 2010), siendo uno de los mecanismos de resistencia más importantes. En nuestro laboratorio hemos reportado la presencia de la mutación L1014F en una población resistente de *T. infestans* situada en la localidad de Madrejones (Pcia. De Salta) (Fabro *et al.*, 2012) y además hemos encontrado la mutación L925I en una población de *T. infestans* resistente de la localidad El Malá (Pcia. de Chaco) (Capriotti *et al.*, 2014).

En cuanto al mecanismo detoxificativo de compuestos se sabe que existe una expansión de las GST de la clase Sigma, la expansión de las CYP3 en la superfamilia CYP y del clado E en la superfamilia de las CCE en Triatominos (Traverso *et al.*, 2017). También se ha encontrado la sobreexpresión de genes CYP en cepas resistentes de *T. infestans*, luego de la exposición a deltametrina (Grosso *et al.*, 2016; Traverso *et al.* 2017); y se ha reportado un aumento de en la expresión de genes relacionados a proteínas de cutícula en cepas resistentes de *T. infestans* (Calderón-Fernández *et al.*, 2017).

1.9 Problemas de los insecticidas neurotóxicos y manejo integrado de vectores

Los insecticidas son tóxicos que tienen el objetivo de eliminar eficazmente las especies de insectos consideradas plagas o nocivas para el ser humano. Desafortunadamente, también tienen efectos secundarios: surgimiento de resistencia, mortalidad de especies benéficas, acumulación en la cadena alimentaria, contaminación del agua, etc. Esto redundo en un alto impacto ambiental y la pérdida de eficiencia en el control de plagas, además de efectos tóxicos sobre humanos y otros animales (Audsley e Down, 2015) . Por lo anterior, muchos de ellos han sido retirados del mercado o restringidos (como por ejemplo ciertos neonicotinoides y el DDT) y/o resultan ineficaces frente a determinadas poblaciones de insectos plaga, con lo que las opciones disponibles se reducen de manera alarmante. El desarrollo de la neurotoxicidad es uno de los riesgos tóxicos más importantes de los insecticidas. Durante las últimas siete décadas se han desarrollado varias clases de insecticidas, cada uno con sus propios mecanismos de acción y sus efectos secundarios.

El manejo integrado de vectores (MIV) plantea un proceso racional de toma de decisiones para optimizar el uso de recursos para el control de vectores, en pos de mejorar

la eficacia, rentabilidad, solidez ecológica y sostenibilidad de las intervenciones de control de vectores con las herramientas y recursos disponibles (WHO, 2012). Las fallas en los programas de control comúnmente se deben a factores tales como la inadecuada elección de un insecticida o momento de aplicación, programas abocados al control de un solo vector de enfermedad, el cambio climático, la urbanización. Otros sectores, como la agricultura y la construcción, a menudo no son conscientes de las consecuencias de sus acciones en la incidencia de enfermedades transmitidas por vectores. Las intervenciones actuales de control de vectores dependen en gran medida del uso de una selección limitada de insecticidas, por lo tanto, el desarrollo de resistencia podría socavar los esfuerzos de control a menos que se tomen medidas de mitigación adicionales.

Por lo expuesto, resulta urgente identificar insecticidas con distintos modos de acción, que permitan diversificar y ampliar las herramientas para el control de artrópodos de importancia económica y sanitaria (WHO, 2012) . Estos compuestos deberían ser eficientes a dosis bajas, amigables con el medio ambiente, sostenibles, costo-efectivos y seguros para mamíferos (WHO, 2012 (Dias e Moraes, 2014).

1.10 Neuropéptidos en insectos.

Los neuropéptidos son moléculas de señalización entre células en todos los organismos multicelulares; pueden actuar como neurotransmisores o como hormonas en la regulación endocrina. Son codificados en precursores proteicos, que son clivados y modificados post-traduccionalmente para originar los péptidos maduros con actividad biológica (Sossin *et al.*, 1989). Los precursores de neuropéptidos codifican en su secuencia un péptido señal y un número variable de péptidos, separados entre sí por sitios de clivaje proteolítico (Nassel, 2002). Los precursores poseen en su región N - terminal una secuencia hidrofóbica que abarca entre 20 a 30 aminoácidos, llamada péptido señal. El péptido señal dirige a la proteína emergente a la luz del retículo endoplásmico para posteriormente ser dirigido a través de la vía secretora. El primer paso en la maduración de los neuropéptidos es la eliminación del péptido señal por enzimas proteolíticas específicas. Una segunda modificación postraducciona es la escisión por endopeptidasas en sitios de escisión proteolítica. En insectos, la segmentación ocurre en sitios dibásicos (Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Lys, Lys-Arg), y también en sitios monobásicos (generalmente Arg) siempre que un aminoácido básico (Arg, Lys o His) esté presente en posición -4, -6 o -8 (siendo +1 el residuo de aminoácido ubicado en el C - terminal y el 1 ubicado en el

N- terminal) (Southey *et al.*, 2008; Veenstra, 2009). Finalmente, después de la escisión, muchos neuropéptidos sufren modificaciones postraduccionales que son esenciales para su papel biológico. En insectos, la modificación más común es la amidación en la región C - terminal; cada vez que un residuo Gly se encuentra en el extremo C – terminal del péptido, es eliminado por una monooxigenasa específica, dejando una amida del enlace peptídico (Sossin *et al.*, 1989). También pueden ocurrir la oxidación y la formación de piroglutamato en el extremo N- terminal, aunque resultan menos habituales (Sossin *et al.*, 1989; Nassel, 2002). Los genes precursores de neuropéptidos pueden codificar desde uno hasta decenas de péptidos maduros; usualmente múltiples miembros de la misma familia (péptidos centrales conservados) están codificados en un solo gen precursor. El precursor de los neuropéptidos también codifica secuencias no conservadas que se denominan "péptidos espaciadores". Si bien el papel fisiológico de los péptidos espaciadores no se ha estudiado a fondo, se supone que la actividad biológica reside en los péptidos centrales (Wegener e Gorbashov, 2008). En la **Figura 1. 4** se muestra un esquema de la estructura de un gen precursor de neuropéptidos.

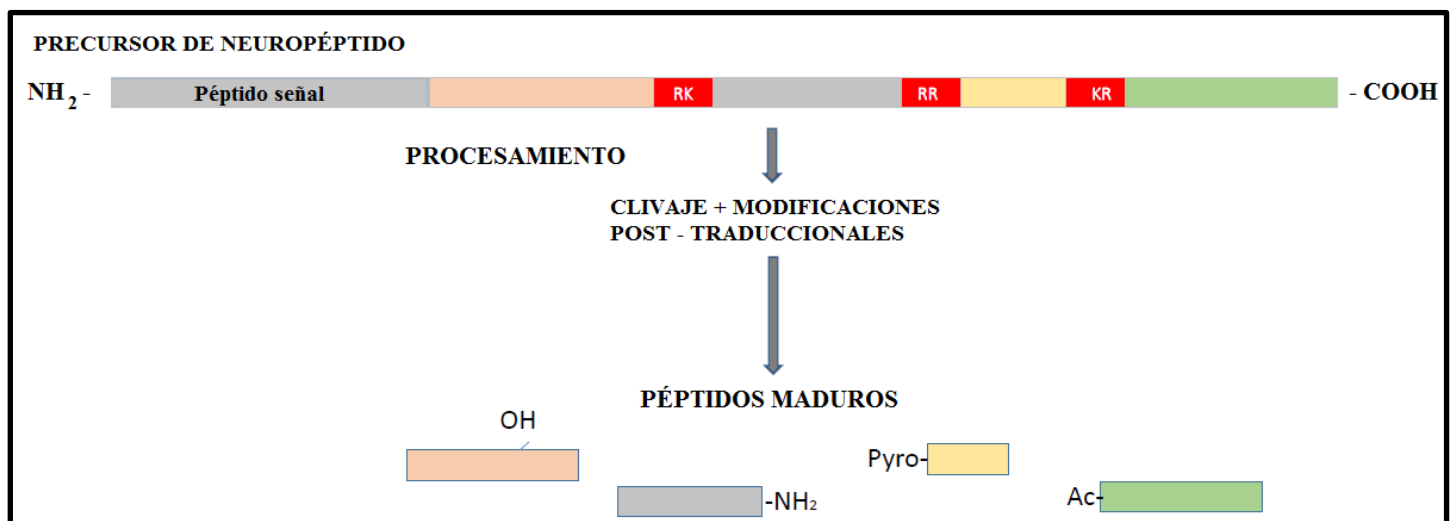


Figura 1.4: Gen precursor de Neuropéptidos. Los neuropéptidos se producen como parte de proteínas precursoras más grandes, conocidas como prepropéptidos, que están codificados en el genoma. Estos pueden dar lugar a uno o varios péptidos bioactivos. Los genes que codifican neuropéptidos se transcriben en el núcleo. Después del corte y empalme, el ARNm se traduce en los ribosomas y, con la ayuda de un péptido señal, el prepropéptido inmaduro se incorpora en la ruta secretora y termina en vesículas. A medida que las vesículas son transportadas a la terminación del axón, se procesa el precursor. Los péptidos bioactivos están cada uno rodeados por sitios de escisión mono o dibásicos tales como KR o RR que se muestran aquí, que dirigen peptidasas para liberar enzimáticamente los péptidos. Finalmente, pueden producirse modificaciones posteriores a la traducción (Yeoh *et al.*, 2017).

Aunque los órganos periféricos de los insectos poseen células neuroendocrinas, la expresión de la mayoría de los neuropéptidos se produce principalmente en el sistema nervioso central (SNC), donde se liberan al ambiente extracelular por exocitosis. Los neuropéptidos pueden llegar a los órganos periféricos a través de proyecciones neuronales, o ser liberados en la hemolinfa en sitios neurohemales.

La mayoría de los neuropéptidos de insectos actúan sobre receptores de membrana acoplados a proteína G (GPCR) (Brody e Cravchik, 2000; Hauser *et al.*, 2006; Hill, 2006; Hauser *et al.*, 2008), mientras que otros actúan sobre receptores de tirosina kinasa como los péptidos similares a la insulina de *D. melanogaster* (Brogiolo *et al.*, 2001) o sobre los receptores de guanilato ciclase unidos a la membrana, como la hormona de eclosión (Chang *et al.*, 2009). La expresión heteróloga de GPCRs en diferentes sistemas celulares permitió la identificación de ligandos peptídicos la mayoría de los GPCR de *D. melanogaster* (Ewer, 2005; Hauser *et al.*, 2006).

El patrón de expresión del receptor de un neuropéptido también puede dar pistas sobre un papel fisiológico. Los GPCRs constituyen una de las familias más importantes de proteínas de la superficie celular. Estos receptores median prácticamente todos los procesos fisiológicos y de comportamiento de los insectos por la transmisión de señales a través de la membrana (Vogel *et al.*, 2013; Lismont *et al.*, 2015). Algunos neuropéptidos pueden activar dos o más receptores relacionados. La misma molécula receptora puede acoplarse a diferentes proteínas G en diferentes tipos de células, lo que conduce a diferentes resultados. Esto genera una red de neuropéptidos extremadamente compleja que está situada en gran medida en interneuronas, conectando neuronas sensoriales y motoras.

El nombre de las familias de neuropéptidos en insectos ha creado confusión. Tradicionalmente, los neuropéptidos fueron nombrados por la primera función descrita. Sin embargo, los neuropéptidos pueden tener múltiples funciones dentro de la misma especie o en diferentes especies y, por lo tanto, clasificarse en varias categorías (Yeoh *et al.*, 2017). A continuación, se describen algunas de las familias de neuropéptidos y sus representantes peptídicos más importantes:

- **Hormonas asociadas al desarrollo y ecdisis.** Los neuropéptidos, junto con los ecdisteroides y la hormona juvenil, regulan el desarrollo y la ecdisis. Los neuropéptidos que regulan centralmente el proceso de ecdisis en insectos son la **Hormona disparadora de la Ecdisis (ETH)**, la **Hormona de la Eclosión (EH)**

(las cuales forman un circuito de retroalimentación positiva), la Corazonina (CZ) y el péptido cardioactivo de crustáceos (CCAP) (Zitnan e Adams; 2012). El **péptido cardioactivo de crustáceos (CCAP)** es crítico para el proceso de ecdisis en *Tribolium castaneum* y *R. prolixus*, ya que cuando su expresión fue bloqueada mediante ARNi, los insectos no fueron capaces de mudar normalmente y presentaron un fenotipo letal (Arakane et al 2008; Lee et al., 2013). También se ha involucrado a CCAP en la cascada de señalización que regula la ecdisis en *M. sexta* (Kim et al., 2006) y *D. melanogaster* (Ewer, 2005). En un trabajo reciente de nuestro laboratorio se ha demostrado la implicación de las **Orcokininas** en la regulación de la ecdisis en *R. prolixus* (Wulff et al., 2017)

- **Péptidos asociados a la alimentación.** La alimentación de un insecto depende de múltiples factores, como la edad, el estado nutricional, el ambiente y la actividad. Los neuropéptidos que regulan la alimentación en insectos son: **sulfakininas (SK)** inhiben la ingesta de alimentos en varias especies que incluyen cucarachas, langostas y moscas, posiblemente mediante la estimulación de las contracciones intestinales (Chowanski et al., 2016). **Neuropéptido F corto (sNPF)** es un potente orexigénico en la mayoría de las especies, aunque antiorexigénico en langostas (Gäde, 2004); esta abundantemente expresado en el SNC. Las **allatostatinas (AST)** y la **allatotropina (AT)**, dos familias de neuropéptidos descubiertas inicialmente en las cucarachas por su papel en la regulación de la liberación de la hormona juvenil de la *corpora allata*, también están involucradas en el comportamiento de alimentación (Gäde, 2004).
- **Péptidos asociados al mantenimiento de la homeostasis de agua e iones.** La diuresis (pérdida de agua) ocurre en respuesta a la alimentación y después de la eclosión. El primer péptido diurético descrito fue AVP-DH (*Arginine Vasopresin like Diuretic Hormone*) identificado en *Locusta migratoria*. Posteriormente, fue descrito **CRF-DH** (*Corticotropin-releasing factor-related diuretic*) (Gäde, 2004). Dicha hormona, también denominadas DH44, se identificó por primera vez en *M. sexta* (Kataoka et al., 1989) y, hasta la fecha, su aparición se ha confirmado en una amplia variedad de especies: el escarabajo *Tenebrio molitor* (Furuya et al., 1998), *R. prolixus* (Ons et al., 2011; Te Brugge et al., 2011), la polilla *Hyles lineata* (Furuya et al., 2000), *P. americana* (Kay et al., 1992), las langostas *L. migratoria* (Kay et al., 1991) y *S. gregaria* (Van Wielendaele et al., 2012), entre otras.

Otra hormona diurética, identificada por primera vez en *Dasyprocta punctata*, es la **hormona diurética similar a la calcitonina (CT / DH)**, también llamada DH31 (Furuya *et al.*, 2000). Posteriormente, fue identificado CT / DHs en *D. melanogaster* (Coast *et al.*, 2001), *R. prolixus* (Te Brugge *et al.*, 2005) y *An. gambiae* (Coast *et al.*, 2005). Algunos de los péptidos asociados al proceso de anti diuresis son los péptidos **CAPA α y β** en *R. prolixus* (Paluzzi *et al.*, 2008; Paluzzi *et al.*, 2010) y el **péptido transportador de iones (ITP)** con sus dos isoformas A y B en *L. migratoria* (Audsley *et al.*, 1992).

- **Péptidos asociados al metabolismo energético.** La actividad de un insecto requiere de un suministro constante de energía. Esto implica la movilización de lípidos y carbohidratos. Este proceso está controlado hormonalmente por neuropéptidos pequeños. Las **Hormonas Adipokinéticas (AKH)** se encuentran involucradas en la homeostasis de carbohidratos en hemolinfa mediante la estimulación de su liberación en momentos en que los insectos no se encuentran en intensa actividad física. En *D. melanogaster*, este proceso es contrarrestado por **Péptidos simil-Insulina (ILP)**, los que disminuyen la concentración de carbohidratos en hemolinfa. Por lo tanto, AKHs e ILPs en insectos actúan de manera similar al glucagón e insulina en mamíferos durante la homeostasis de azúcar en sangre (Kim e Rulifson, 2004).
- **Péptidos RF-amida.** El motivo C-terminal RF-amida es compartido por varias familias de neuropéptidos: FMRM amida, miosupresina (MS), sulfakinina (SK), neuropéptido corto F (sNPF) y neuropéptido largo F (LNF). Todos estos péptidos se diferencian por la secuencia y la longitud de su región N-terminal. A pesar de que diferentes funciones fueron descritas para los péptidos RF-amida, varios de ellos son cardioactivos en insectos (Rasmussen *et al.*, 2015). Una serie de péptidos RF-amida en *R. prolixus* presentan secuencias inusuales en comparación con péptidos de la misma familia en otras especies, a pesar de estar altamente conservados (Ons *et al.*, 2009; Ons *et al.*, 2011; Ons, 2017)
- **Péptidos implicados en la percepción sensorial.** La participación de varios neuropéptidos en la regulación de la percepción sensorial y el comportamiento en insectos está bien documentada (Nassel e Winther, 2010). A pesar de que los triatomíneos han sido modelos de estudios de neuroetología que incluyen olfacción, comunicación a través de feromonas y diversas formas de aprendizaje y memoria (Guerenstein e Lazzari, 2009; Vinauger e Lazzari, 2015) hasta el momento no se

han hecho estudios de la implicancia que los neuropéptidos tiene en dichos procesos. Sin embargo, un estudio reciente demuestra una alta expresión de muchos neuropéptidos en antenas de *R. prolixus* (Latorre-Estivalis *et al.*, 2017).

En la **Tabla 1. 2** se resumen los neuropéptidos y sus funciones asociadas en *R. prolixus*:

Nombre	Número de acceso	Motivo conservado	Tipo de receptor	Actividad Biológica	Referencias
Neuropéptido ACP	KM975505	QVTFSRDTNA-amida	GPCR-Familia A	Sin datos	Patel et al. (2014), Zandawala et al. (2015a)
Hormona Adipokinética	GQ888667	QLTFSTDW-amida	GPCR-Familia A	Movilización de lípidos	Patel et al. (2014), Zandawala et al. (2015b), Alves-Bezerra et al. (2016)
Allatotropina	GQ162783	GFKNVQLSTARGF-amida	GPCR-Familia A	Expulsión de saliva Cardioacelerador Diuresis	Masood y Orchard (2014), Villalobos-Sambucaro et al. (2015)
AST-CC	RPRC000300	GQKKGRIYWRCYFNAVTCF	GPCR-Familia A	Sin datos	Sin datos
Calcitonin-like diuretic hormone A	GQ856316	GLDLGLSRGFGSQAACHLMGLAAANYAGGP-amida	GPCR-Familia B	Alimentación	Te Brugge et al. (2005, 2009), Zandawala et al. (2013)
Calcitonin-like diuretic hormone B	GQ856317	GLDLGLSRGFGSQAACHLMGLAAANYAGGP-amida	GPCR-Familia B	Alimentación	Te Brugge et al. (2005, 2009), Zandawala et al. (2013)
Calcitonin-like diuretic hormone C	HM030715	GLDLGLSRGFGSQAACHLMGLAAANYAGGP-amida	GPCR-Familia B	Alimentación	Te Brugge et al. (2005, 2009), Zandawala et al. (2013)
CAPA α	ABS17680	SPISSVGLFPFLRA-amida; EGGFISFPRV-amida	GPCR-Familia A	Antidiuresis	Ianowski et al. (2010), Paluzzi et al. (2008, 2012), Te Brugge et al. (2011)
CAPA β	ACH70295	SPITSIGLLPFLRAA; EGGFISFPRV-amida	GPCR-Familia A	Antidiuresis	Ianowski et al. (2010), Paluzzi et al. (2008, 2012), Te Brugge et al. (2011)
CCH- amida	KQ034137	GGCSAFGHSCFGGH-amida	GPCR-Familia A	Sin datos	Sin datos
CNM-amida	RPRC010893	ASYMSLCHFKICNM-amida	GPCR-Familia A	Sin datos	Sin datos
Corazonina	KQ034239	pyro-QTFQYSRGWTN-amida	GPCR-Familia A	Cardioacelerador	Patel et al. (2014)
CRF like Diuretic Hormone	HM153808	MQRPGGPSLSVANPIEVLRSRLLEIARRRMKEQDASRVSKNRQYLQQI-amida	GPCR-Familia B	Diuresis	Te Brugge et al. (2009, 2011)
Péptido Cardioactivo de Crustáceos	GQ888668	PFCNAFTGC-amida	GPCR-Familia A	Mioacelerador en recto Cardioactivo Ecdisis	Lee y Lange (2011), Lee et al. (2013a)
Hormona de Eclosión	RPRC014242	MFGVYFEGQMCADTCLKYKGKLIPDCEDIASIGPFLNKL	Guanilato ciclasa	Sin datos	Sin datos
Elevenina-1	RPRC003083	YLLTIFVWLCLITLPLALAQGENENGTVDVC; YPYAPVCRGAGA; LYLYSPQEINYEDMANYEDMA	GPCR-Familia B	Sin datos	Sin datos

Elevenina-2	RPRC003084	DLLNIFVWLCLITLLLALTSKSQ VIGKNGQIVDC; YVFAPVCRGAGA; SYPPRFSPQEINYEDLAEIILDSY PIG-amida	GPCR-Familia B	Sin datos	Sin datos
ETH	RPRC014486	NDDFFYAKNLKTVPRI-amida; NGFTATLAADGRSGARVD	GPCR-Familia A	Sin datos	Sin datos
FLP	RPRC014988	NFMRF-amida; NFIRF-amida	GPCR-Familia A	Estimulación de las contracciones en estructuras reproductivas femeninas	Sedra y Lange (2014)
FGL-amida AST	GQ856315	SFGL-amida	GPCR-Familia A	Efecto mioinhibitorio en recto e intestino anterior Inhibe frecuencia cardiaca de corazón	Zandawala et al. (2012)
Kinina	BK007870	FX1X2WG-amida; FSX3WA-amida	GPCR-Familia A	Estimulador de las contracciones en recto e intestino medio anterior Eventos relacionados a la alimentación	Bhatt et al. (2014), Sterkel et al. (2011), Te Brugge et al. (2009), Te Brugge y Orchard (2011)
Péptido simil insulina -1	RPRC009717	GARQKYCGRILDDTLKFICRGK YNERFPS-amida	Tirosin a quinasa	Regulación del metabolismo energético Ritmo circadiano	Defferrari et al. (2016), Vafopoulou y Steel (2014)
Péptido simil insulina -2	GU230850	APLGGFKFCGKDLSDILAEVCS GRGYNVAFDKGSHNNHRTKR GIVDECCRRFCTWTTLEAYCS	Tirosin a quinasa	Regulación del metabolismo energético Ritmo circadiano	Defferrari et al. (2016), Vafopoulou y Steel (2014)
Péptido simil insulina -3	GL562992	RKKRDSLRLNECCRKACSVSEILS YC	Tirosin a quinasa	Regulación del metabolismo energético Ritmo circadiano	Defferrari et al. (2016), Vafopoulou y Steel (2014)
Péptido simil insulina -6	GL563143	ELASWLLYLSQHHDQPHKRNSE IINSLLGIPKVLIDAGR	Tirosin a quinasa	Regulación del metabolismo energético Ritmo circadiano	Defferrari et al. (2016), Vafopoulou y Steel (2014)
Péptido Transportador de Iones A	GQ253921	GPSSRLVLSHPLN; SFFDLQCKGVYDKSIFARLDRIC EDCYNLFR	GPCR-Familia A	Sin datos	Sin datos
Péptido Transportador de Iones B	GU207866	EPQLHSLCRSDCFASKYFAGCL EALLLREEENKFFQMVEFL- amida GPSSRLVLSHPLN; SFFDLQCKGVYDKSIFARLDRIC EDCYNLFR EPQLHSLC; NCFTTDYFKGCLEVLLQDEME NIQTWIKQLHGAPEV	GPCR-Familia A	Sin datos	Sin datos
ITG-like	GL562724	ITGKTAAFNHL	Sin datos	Procesos relacionados a la alimentación	Sterkel et al. (2011)

Neuropéptido Largo F	RPRC008107	RPKSFASPDLLRITYLDQLGQYY AVAGRPRF-amida	GPCR-Familia A	Mioinhibitorio en recto	González y Orchard (2009)
Neuropéptido Corto F	GQ452380	NNRSPQLRLRF-amida	GPCR-Familia A	Inhibidor contracción corazón	Datos sin publicar
Péptido Mioinhibidor	KQ034158	W(6X) W; W(7X) W	GPCR-Familia A	Mioinhibitorio en recto y oviducto	Lange et al. (2012), Sedra et al. (2015)
Miosupresina	GQ344501	QDIDHVFMRP-amida	GPCR-Familia A	Inhibición de las contracciones en aorta, intestino medio y recto Inhibición de aumento del tono basal en oviducto	Leander et al. (2015), Lee et al. (2012), Sedra et al. (2015)
Natalisina	RPRC003680	FWX4X5R-amide	GPCR-Familia A	Sin datos	Sin datos
Neuroparaisina A	GU207864	VFYGCVPCIGDECNLPNCNPY GIVRDPCGRLVCAAGPGERCGG RDFHLGKCGEGLSCKCGKCRG CSIKQIMNGRIDCDTTNPMCQ	Tirosin a quinasa	Sin datos	Sin datos
Neuropeptide-like precursor 1	GU207865	GPYQT-amida; SPELGF-amida; NVKEG-amida AVKF-amida; LLRQ-amida; LPJVG-amida; RHENS-amida	Guanila to ciclaza	Procesos relacionados a la alimentación	Sterkel et al. (2011)
NVP-like	RPRC003052	SRDLYYNMLLRNLELTQNLHND PFNYDFPSYSVMDGRF; IPTSILEDLKNVQLQSPIRSNKHF INVV; AQEFIMFGNQNRAPSFNSIRND	Sin datos	Procesos relacionados a la alimentación	Sterkel et al. (2011)
Orcokinina A	FJ167860	NFDEIDRX6GFX7X8FX9	Sin datos	Procesos relacionados a la Ecdisis y a la Muda	Wulff et al. (2017)
Orcokinina B	JF761320	N terminal: GX10DX11; C terminal: GGGHLX12	Sin datos	Procesos relacionados a la Ecdisis y a la Muda	Wulff et al. (2017)
Orcokinina C	KF179047	N terminal: GX10DX11; C terminal: GGGHLX12	Sin datos	Procesos relacionados a la Ecdisis y a la Muda	Wulff et al. (2017)
Pigment dispersing factor	KQ034061	ELASWLLYLSQHHDQPH; NSEIINSLLGIPKVLIDA-amida	GPCR-Familia B	Ritmo circadiano	Vafopoulou y Steel (2014)
Pirokinina α	ABS17680	NGGGGNGGGLWFGPRL-amida	GPCR-Familia A	Sin datos	Sin datos
Pirokinina β	ACH70295	IGGGGNGGGLWFGPRL-amida	GPCR-Familia A	Sin datos	Sin datos
PISCF AST	KQ034609	AQAGAAEIQQ-amida; SYWKQCAFNAVSCF-amida	GPCR-Familia A	Sin datos	Sin datos
Proctolina	JN543225	RYLPT	GPCR-Familia A	Estimula contracciones de recto, intestino anterior y corazón	Orchard et al. (2011)

RYamida	RPRC00046 1	DSFFMNGRY-amida	GPCR- Familia A	Sin datos	Sin datos
SIF amida	GQ253922	PPFNGSIF-amida	GPCR- Familia A	Sin datos	Sin datos
Sulfakininas	GQ162784	pyro-QFNEYGHMRF-amida; GGSDEKFDDYGYMRF-amida	GPCR- Familia A	Sin datos	Sin datos
Takikininas	GQ162785	X13GFX14GX15R-amida	GPCR- Familia A	Sin datos	Haddad et al. (2018)
Tabla 1.2. Extraída y modificada de Ons, 2017					

Los neuropéptidos y sus receptores han sido propuestos como posibles moléculas blanco para el desarrollo de una nueva generación de insecticidas (Gäde, 2004; Scherkenbeck e Zdobinsky, 2009; Audsley e Down, 2015; Lismont *et al.*, 2015; Verleyen *et al* 2014). En este sentido, sus mecanismos de acción y función biológica asociada proporcionan objetivos bioquímicos y fisiológicos promisorios. La disrupción de la unión al sitio blanco (receptor) o de la transducción de señales por pequeñas moléculas orgánicas parece ser la estrategia más directa con respecto al surgimiento de un insecticida basado en neuropéptidos (Scherkenbeck e Zdobinsky, 2009). Sin embargo, los neuropéptidos de insectos tienen una serie de características que complicarían su uso: inestables en el entorno, baja solubilidad tanto en soluciones orgánicas como acuosas, y sufren una rápida degradación en el sistema digestivo de los insectos (Scherkenbeck e Zdobinsky, 2009). En los últimos años se han dedicado esfuerzos para superar estos posibles inconvenientes (Scherkenbeck e Zdobinsky, 2009). Por lo anterior, el estudio de la fisiología de neuropéptidos en insectos reviste importancia tanto en entomología básica como aplicada al control de especies perjudiciales.

1.11 El sistema neurosecretor en triatominos.

El sistema nervioso central (SNC) en los triatominos está compuesto por el cerebro, el ganglio subesofágico (SOG) , el ganglio protorácico (PTG) y la masa ganglionar mesotorácica (MTGM) (Insausti, 1994). Los nervios abdominales (ABN) y la *corpora cardiaca* (CC) son sitios neurohemales donde los neuropéptidos se liberan desde el SNC a la hemolinfa (**Figura 1.5**). Las células neurosecretoras (NSCs) y / o sus proyecciones se detectan en cerebro, ganglios del SNC y sitios neurohemales. Se han identificado grupos de NSCs: (a) lateral anterior (LANS) y dorsal (DNS) en el cerebro (que contiene factores relacionados con ritmo circadiano) (Steel e Vafopoulou, 2006), (b)

medial (MNS) en el cerebro que contiene factores hormonales relacionados con la ovogénesis (Kriger e Davey, 1982), (c) lateral posterior (PL); neuronas mediales-dorsales desapareadas (DUM) en MTGM (que contienen hormonas diuréticas), y (d) ventromediales (VM) en MTGM (que contienen factores antidiuréticos) (Ons, 2017).

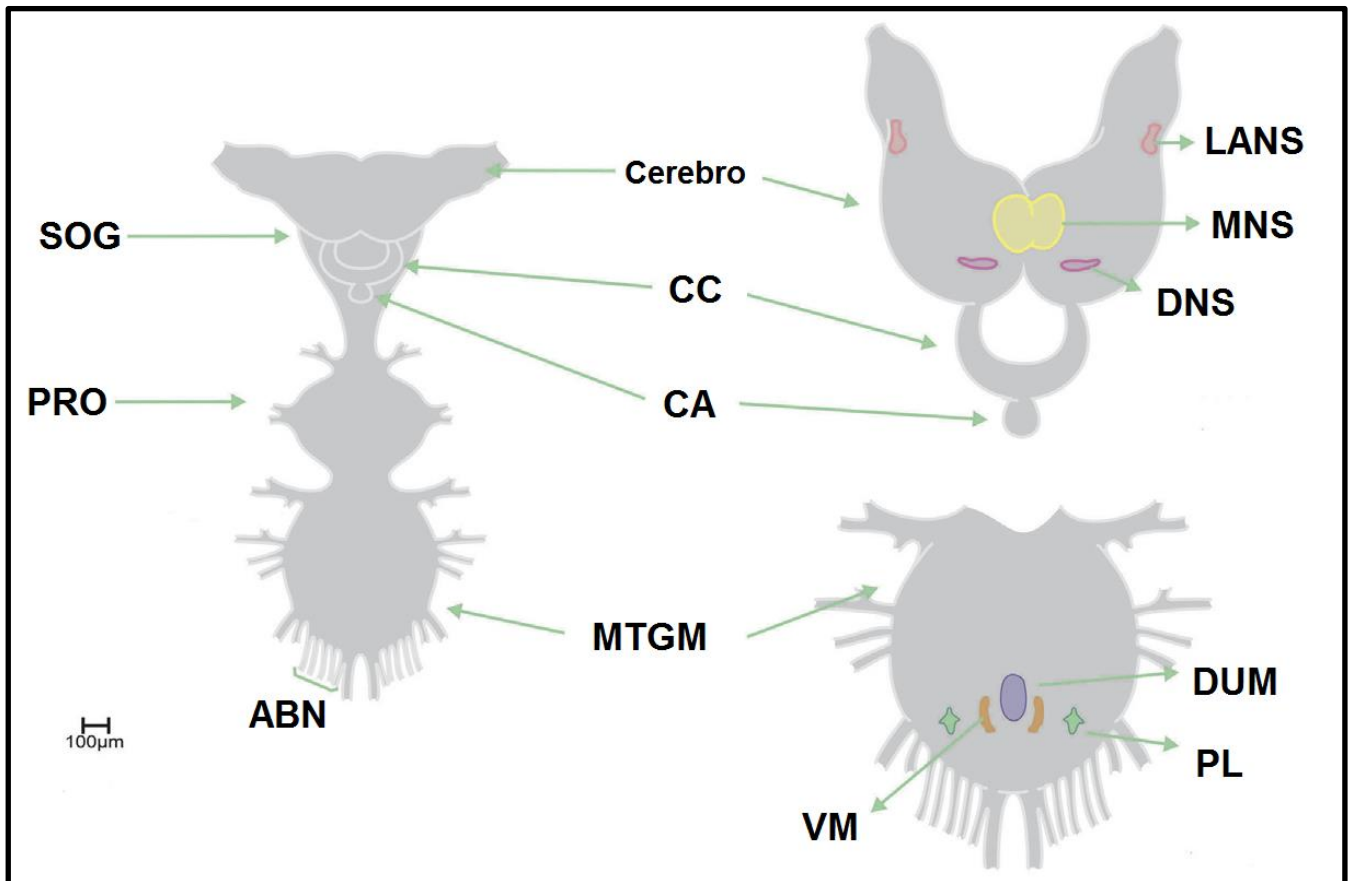


Figura 1.5: (A) Representación esquemática del Sistema Nervioso Central en Triatominos. ABN: Nervios Abdominales; CA: Corpora Allata; CC: Corpora Cardia; PRO: Ganglio Protorácico; SOG: Ganglio Subesofágico. (B) Diagrama de las áreas compuestas por células neurosecretoras (NSCs). DNS: Células Neurosecretoras Dorsales; DUM: Neuronas Dorsomediales Desapareadas; LANS: Neuronas Anteriores Laterales; MNS: Células Neurosecretoras Mediales; PL: Células Neurosecretoras Laterales Posteriores; VM: Células Neurosecretoras Ventromediales Imagen modificada y extraída de Ons., 2017

1.12 *Rhodnius prolixus* como modelo de estudio en la fisiología de insectos.

R. prolixus (Stål, 1859) (Hemiptera: Reduviidae) es un insecto hemimetábolo que se alimenta exclusivamente de sangre de vertebrados durante toda su vida. Come esporádicamente, y puede permanecer varias semanas sin ingerir. Durante su desarrollo post-embionario transcurre por cinco estadios ninfales hasta alcanzar la etapa adulta, reproductivamente madura; su ciclo de vida es relativamente corto respecto a otros triatomíneos (aproximadamente 4 meses) (Buxton, 1930).

La fisiología de *R. prolixus* ha sido estudiada desde principios de siglo XX, puesto que se ha utilizado como especie modelo en los primeros estudios de fisiología de insectos (Wigglesworth, 1947; Wigglesworth, 1975; 1987). La primera colonia de laboratorio fue establecida en 1930, y fue fundamental para determinar el ciclo de vida de triatomíneos (Buxton, 1930); Wigglesworth, 1934). Ha sido el modelo elegido por Sir Vincent Wigglesworth para estudiar la regulación del crecimiento y el desarrollo (Edwards, 1994; 1998) y por S.H. Maddrell para el estudio de la regulación del balance hídrico-mineral (Maddrell, 1964a; Coast, 2009).

La ventaja de *R. prolixus* como modelo experimental reside en que los insectos ayunados permanecen en un estado de arresto del desarrollo. La ingesta de sangre dispara procesos que llevan a la muda y ecdisis, o gametogénesis en el adulto. Estos procesos ocurren un número determinado de días después de la ingesta, con lo que los experimentos pueden coordinarse y datarse de manera eficiente. De manera similar, la comida sanguínea dispara los procesos de diuresis (inhibidos durante los períodos de ayuno), con lo que también resulta un modelo conveniente para estudios sobre diuresis, anti-diuresis y osmoregulación. Además, su tamaño relativamente grande en comparación con otros insectos ha facilitado la realización de manipulaciones quirúrgicas de distinto tipo. La importancia médica y científica de la especie ha motivado que fuera el primer genoma de hemimetábolos en ser secuenciado completamente (Mesquita *et al.*, 2015); la información genómica facilita enormemente los estudios genéticos y moleculares.

1.13 Sistema excretor en insectos.

El sistema excretor de los insectos está compuesto por el tubo digestivo y los túbulos de Malpighi. El tubo digestivo se divide en tres regiones: el intestino anterior, el medio y el posterior. El intestino anterior y el intestino medio están separados por la válvula estomodeal o cardíaca que impide el reflujo del material en digestión. En *R. prolixus* el intestino medio anterior, denominado también buche, es una estructura que almacena la sangre y ocupa un gran espacio en el hemocele. Desde el buche, la fracción de plasma de la sangre ingerida se transporta a la hemolinfa. El volumen generado pasa desde la hemolinfa hacia los túbulos de Malpighi, desde donde es excretado como orina primaria. Los túbulos de Malpighi son estructuras tubulares largas con un extremo ciego, que emergen del intestino medio en la unión con el intestino posterior (**Figura 1.6**). El número y la longitud de los túbulos de Malpighi varían entre los grupos de insectos. Los triatominos poseen 4 túbulos de Malpighi, de aproximadamente 100 μm de diámetro y 45 mm de longitud cada uno (Ianowski *et al.*, 2002). Los túbulos de Malpighi se dividen en dos segmentos, el proximal, directamente unido al tubo digestivo, y el distal que compone dos tercios del túbulo total. Estos insectos producen orina a través de transporte activo de iones y transporte de agua por osmosis. El segmento distal transporta fluidos al lumen del túbulo para producir la orina primaria. Esta fluye al segmento proximal, desde donde se reabsorben iones K^+ y Cl^- para formar la orina final, la cual es excretada a través del intestino posterior junto con las heces (Coast, 2009) (**Figura 1.7**).

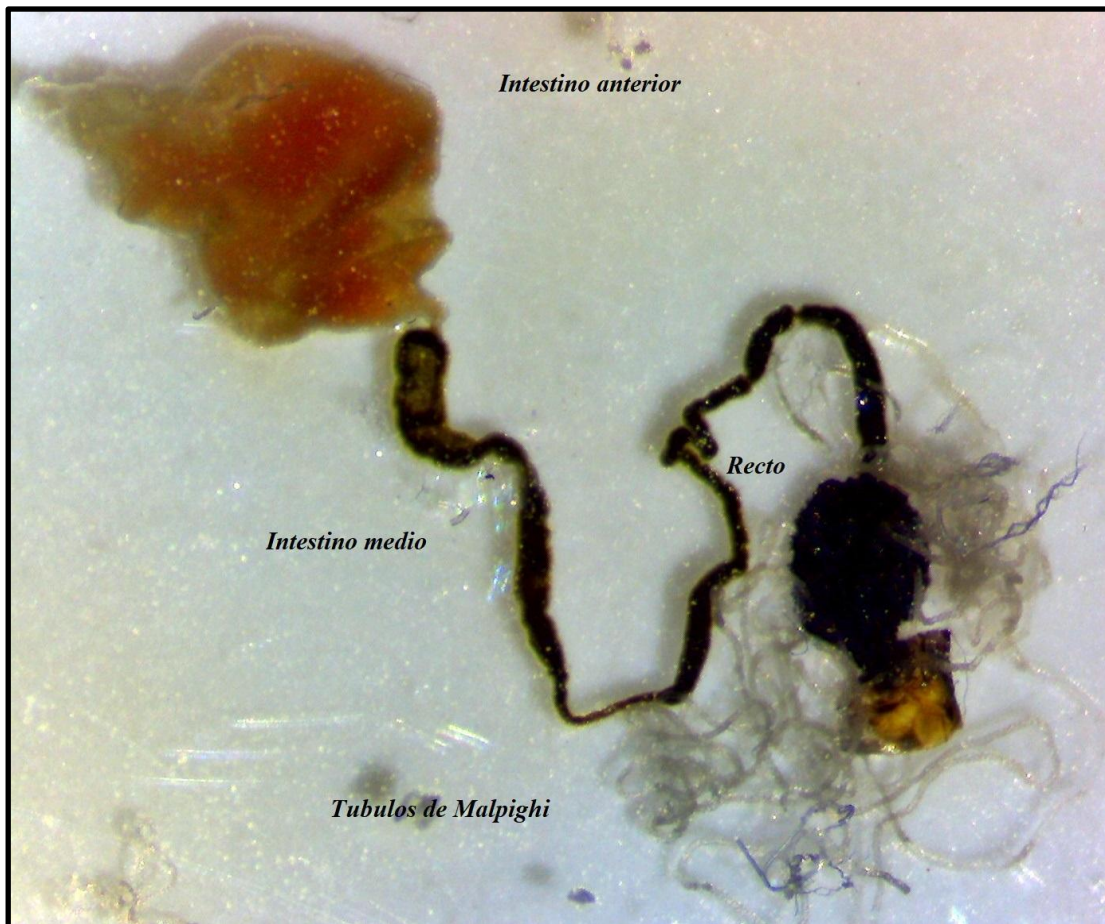


Figura 1.6: Sistema Excretor de *R. prolixu*

1.13.1 Diuresis postprandial en triatominos

Las ingestas de sangre en *R. prolixus* son poco frecuentes pero abundantes. En aproximadamente 15 minutos las ninfas de quinto estadio pueden ingerir el equivalente a 10 veces su propio peso corporal en ayuno (Buxton, 1930). La ingesta de sangre es tan grande que requiere que el animal modifique las propiedades del exoesqueleto, produciendo modificaciones en la cutícula para hacerla más extensible (Ianowski *et al.*, 1998). El aumento en el peso y el tamaño corporal después de la comida restringe la maniobrabilidad del insecto, lo cual aumenta el riesgo de depredación. Además, *R. prolixus* se alimenta de sangre hipo-osmótica respecto a su propia hemolinfa, por lo que la comida representa una amenaza para la homeostasis. Así, estos insectos necesitan realizar una rápida diuresis postprandial, que permite la excreción del 50% del volumen ingerido en aproximadamente 2 horas (Coast, 2009). El proceso de diuresis se inicia rápidamente gracias a la liberación de hormonas diuréticas (Ianowski *et al.*, 1998) (**Figura 1.5**), como serotonina y ciertos neuropéptidos. Debido a las características de su alimentación, la diuresis es un proceso central para el mantenimiento de la homeostasis en hematófagos. Por otra parte, en el caso de triatominos, es el momento en el cual transmiten el parásito *T. cruzi*, con lo que el estudio de este proceso cobra un interés particular.

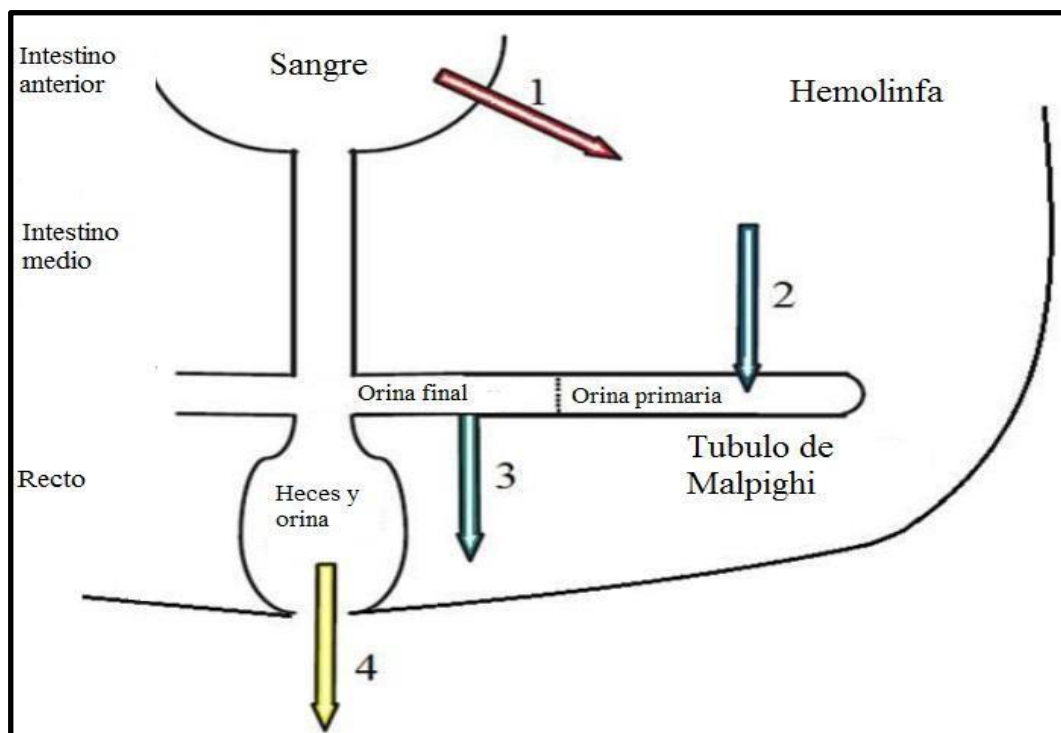


Figura 1.7: Representación de la diuresis post prandial en *Triatominae*. La sangre es almacenada y concentrada en el intestino anterior. La fracción de plasma es transportada a la hemolinfa (1) y luego al lumen del segmento distal del túbulo de Malpighi como orina primaria (2). La orina es modificada en el segmento proximal por reabsorción de K^+ y Cl^- en la hemolinfa, formando la orina final (3). La orina final fluye al recto para luego ser excretada con las heces (4). Adaptación de Coast, 2009.

1.13.2 Factores diuréticos y antidiuréticos en *R. prolixus*.

- **Factores diuréticos:**

Un factor diurético es aquel que incrementa la pérdida de agua en un insecto aumentando la secreción de los túbulos de Malpighi y / o inhibiendo reabsorción de fluidos en el intestino (Gäde, 2004). Los factores diuréticos más potentes descritos hasta la fecha en *R. prolixus* son serotonina (Orchard, 2006) y el neuropéptido *CRF-like diuretic hormone* (CRF-DH). Ambos son liberados a la hemolinfa y estimulan al intestino anterior y a los túbulos de Malpighi para producir orina. Estas hormonas estimulan la formación de orina primaria por el segmento distal a través del transporte transpitelial activo de iones K^+ , Cl^- y Na^+ (Maddrell, Herman, *et al.*, 1991; Te Brugge *et al.*, 2002).

La **serotonina (5-hidroxitriptamina)** es un neurotransmisor que regula las actividades de alimentación en una gran variedad de invertebrados (Long e Murdock, 1983; Nassel, 1988; Haselton *et al.*, 2006) y mamíferos (Simansky, 1996). Se encuentra ampliamente distribuida en todo el sistema nervioso de los insectos y su distribución celular se ha demostrado en varias especies con antisueros específicos (Nassel, 1988). Además de su presencia en las interneuronas centrales, la serotonina también se ha detectado en las neuronas sensoriales (Lutz y Tyrer, 1988), el sistema nervioso estomatogástrico e intestinal (Helle *et al.*, 1995; Klemm *et al.*, 1986; Davis, 1985) y en células neurosecretoras (Nassel y Elekes, 1985; Helle y otros, 1995; Orchard *et al.*, 1989). En *R. prolixus*, se ha detectado inmunoreactividad para serotonina en glándulas salivales, corpora cardiaca, vaso dorsal y el tracto digestivo. Además, se ha detectado inmunoreactividad en las neuronas dorsales mediales desapareadas (DUM) de las proyecciones axonales del MTGM. Es interesante destacar que las células DUM son octopaminérgicas y tienen propiedades eléctricas similares a células DUM de otros insectos (Orchard, 2006). La inmunohistoquímica indica que periféricamente la

serotonina podría tener acción directa sobre los tejidos conectados a neuronas serotoninérgicas, pero también podría ser una neurohormona distribuida a través de la hemolinfa (Orchard, 2006)

En *R. prolixus* la serotonina es liberada a la hemolinfa desde el SNC, por el estímulo de la alimentación (Lange et al., 1989; Orchard., 2006); sus niveles circulantes aumentan notoriamente después de la ingesta. En ninfas 5° estadio de *R. prolixus* el nivel de serotonina en hemolinfa aumenta de 7 nM (en ayuno) a un pico de 115 nM (5 min después del inicio de la alimentación). Actúa a través de la vía de AMPc (Maddrell et al., 1993) para aumentar la secreción en la parte distal (superior) de los túbulos de Malpighi de *R. prolixus* estimulando el transporte de NaCl / KCl, mientras que estimula la reabsorción de KCl del segmento proximal (inferior) (Maddrell e Gee, 1974). La parte proximal del túbulo de Malpighi tiene baja permeabilidad al agua y esto se reduce aún más por la serotonina (O'Donnell et al., 1982). Como consecuencia, el fluido secretado por el túbulo distal es isosmótico con hemolinfa (Maddrell y Phillips, 1975).

El péptido **CRF-DH** tiene una potente actividad diurética en ensayos *in vitro*; estimula la tasa de secreción de túbulos de Malpighi, la velocidad de absorción a través del intestino medio anterior y la frecuencia de contracciones del intestino medio (Te Brugge et al., 2011). El gen precursor de *RhoprCRF* codifica un solo péptido amidado conservado (Te Brugge et al., 2011). Se detectó inmunorreactividad similar a CRF-DH en LANS y MNS y en el borde del lóbulo óptico del protocerebro. Un par de células neurosecretoras centrales de MTGM también muestra la expresión de *RhoprCRF* / DH (Te Brugge et al., 2011). Se han inferido cuatro GPCR putativos de CRF-DH en la secuencia genómica de *R. prolixus* (Ons et al., 2016).

Otro péptido con actividad diurética en *R. prolixus* es **Calcitonin-like DH**. El precursor de este péptido produce tres isoformas por *splicing* alternativo, denominadas A, B y C (Ons et al., 2011; Zandawala et al., 2011). La expresión del péptido maduro fue detectada por inmunohistoquímica (Te Brugge et al., 2005; Zandawala et al., 2011) y por espectrometría de masas (Ons et al., 2009) en el SNC. El precursor de la isoforma C se detectó también en un transcriptoma de testículos (Ons et al., 2011). Se observaron proyecciones neuronales positivas sobre las glándulas salivales y el intestino posterior (Te Brugge et al., 2005). En cuanto a sus receptores se caracterizaron dos GPCR de la familia B. Los mismos fueron clonados y a través de ensayos de expresión heteróloga y bioluminiscencia analizados funcionalmente (Zandawala et al., 2013). A partir de la secuencia genómica y el análisis filogenético fueron predichos otros dos GPCRs para esta

hormona, que hasta el momento no han sido caracterizados funcionalmente (Ons *et al.*, 2016). Los dos receptores secuenciados se detectaron en altos niveles de expresión en el SNC y testículos (Zandawala *et al.*, 2013). Los ensayos *in vitro* revelaron que *RhoprCT-DH* produce un pequeño aumento en la tasa de secreción por túbulos de Malpighi (1,5% de la tasa máxima) (Te Brugge *et al.*, 2005) y ningún efecto sobre la composición iónica del fluido secretado (Donini *et al.*, 2008) o sobre el movimiento de agua y sales a través del epitelio del intestino medio anterior (Te Brugge *et al.*, 2009).

El neuropéptido **Kinina** tiene un papel diurético en especies como *Leucophaea maderae* (Tanaka; 2016) y *Aedes aegypti* (Lu *et al.*, 2011), pero no se ha reportado esta función en *R. prolixus*. En esta especie, el precursor de Kinina codifica 24 péptidos maduros putativos; 4 de ellos fueron confirmados por espectrometría de masas (Ons *et al.*, 2009; 2011; Te Brugge *et al.*, 2011; (Sterkel *et al.*, 2011). La expresión de ARNm de *RhoprKinin* se detectó en SNC, intestino posterior y testículos. Análisis bioinformáticos y filogenéticos revelaron la secuencia de un GPCR de familia A que podría ser el receptor de *RhoprKinin* (Ons *et al.*, 2016). Un péptido maduro codificado en este precursor estimuló la contracción muscular del intestino posterior y la frecuencia de las contracciones del intestino medio anterior (Te Brugge *et al.*, 2009; Bhatt *et al.*, 2014). Los niveles de péptidos de *RhoprKinin* en el SNC disminuyeron durante la diuresis (1,5 y 2,5 h después de la alimentación) (Te Brugge e Orchard, 2002), y aumentaron una vez que la diuresis había terminado (4 h después de la alimentación) (Sterkel *et al.*, 2011). Los resultados sugieren un papel de *RhoprKinin* en eventos relacionados con la alimentación.

El neuropéptido **Alatotropina (AT)** es codificado por un precursor que codifica además dos péptidos espaciadores (Ons *et al.*, 2011). Se detectó inmunorreactividad de tipo AT en todo el SNC del insecto (Masood e Orchard, 2014). Además, la expresión de *RhoprAT* se detectó en una base de datos transcriptómica de testículos (Ons *et al.*, 2016). Se ha predicho un GPCR tipo A a través de la información genómica y se detectó por RT-PCR la expresión en el intestino medio anterior, intestino posterior, vaso dorsal, tubulos de Malpighi y ovarios de adultos (Villalobos-Sambucaro *et al.*, 2015). Los ensayos fisiológicos *in vitro* mostraron que *RhoprAT* tuvo un papel en el aumento de la frecuencia de las contracciones aórticas, sólo cuando el insecto fue pretratado con serotonina, y revelaron un efecto sinérgico de ambas hormonas (Masood y Orchard, 2014; Villalobos-Sambucaro *et al.*, 2015). Los resultados *in vivo* mostraron que la cantidad de orina eliminada, la frecuencia de las ondas peristálticas y la tasa de contracciones de la aorta

disminuyeron en insectos previamente alimentados con un antisuero anti-AT (Villalobos-Sambucaro *et al.*, 2015). En conjunto, estos resultados apuntan a un efecto diurético de *RhoprAT*, que no ha sido descrito en otras especies de insectos.

- **Factores antidiuréticos:**

Un factor antidiurético se caracteriza por disminuir la pérdida de agua en el insecto a través de la inhibición de la secreción de fluidos en tubulos de Malpighi y/ o producir la reabsorción de agua e iones en intestino (Gäede., 2004).

En *R. prolixus* el neuropéptido con actividad antidiurética más potente es **CAPA**. La liberación de estos péptidos en hemolinfa implica el cese de la diuresis. Estudios *in vitro* con péptidos sintéticos de *RhoprCAPAa2* demostraron la inhibición en la tasa de transporte de fluidos a través del intestino medio anterior y la tasa de secreción de los tubulos de Malpighi estimulados con serotonina. En el genoma de *R. prolixus* se han identificado dos genes parálogos que codifican péptidos CAPA, denominados *RhoprCAPA-A* y *RhoprCAPA-B* (Paluzzi *et al.*, 2008; Paluzzi y Orchard, 2010). La secuencia de estos genes codifica para tres neuropéptidos maduros putativos, dos CAPA y uno Piroquinina-1 (PK) (Paluzzi *et al.*, 2008; Paluzzi y Orchard, 2010). En *R. prolixus* se expresan en SNC y testículos de ninfas de quinto estadio, pero no en adultos, lo que puede sugerir un papel en la maduración de gónadas masculinas (Paluzzi *et al.*, 2008).

El precursor de **Neuroparisinas** en *R. prolixus* (*RhoprNPA*) es un gen de un exón que codifica un solo neuropéptido maduro putativo. Este péptido no fue detectado por espectrometría de masas en el sistema nervioso central ni en extractos de intestino medio, probablemente debido a su tamaño (Ons *et al.*, 2011). En *L. migratoria* fue descrita una función antidiurética (Girardie *et al.*, 1998; Gäede., 2004). La expresión en el intestino medio anterior de *R. prolixus* podría apuntar a un papel en los procesos relacionados con la diuresis también en esta especie. Recientemente, el receptor de NPA, del tipo tirosina kinasa (TKR) fue identificado por primera vez en insectos en *Ae. aegypti* (Vogel *et al.*, 2015) y por análisis de bases de datos y filogenéticos en *R. prolixus* (Ons., 2017).

El **péptido transportador de iones (ITP)**, fue aislado por primera vez a partir de extractos de la *corpora cardiaca* de *S. gregaria*. En este insecto se reportó su actividad antidiurética dada su capacidad de estimular el transporte activo de Cl_2 en el recto (Audsley *et al.*, 1992). El gen precursor *RhoprITP* presenta dos variantes de *splicing* alternativo: *RhoprITPA* y *RhoprITPB* (Ons *et al.*, 2011). Un péptido corto con la

secuencia GPSSRLVLSHPLN está codificada en las isoformas A y B, mientras que *RhoprITPA* también codifica un péptido amidado, y *RhoprITPB* codifica otros dos péptidos no amidados. La expresión de *RhoprITP* en el SNC y los tejidos aún no se ha informado, así como tampoco ha sido dilucidado el papel fisiológico de la hormona en *R. prolixus*. Recientemente, tres GPCR de *Bombyx mori* fueron informados como receptores Bommo ITP (Nagai *et al.*, 2014). El análisis bioinformático y filogenético permitió identificar dos ortólogos putativos en el genoma de *R. prolixus* (Ons., 2017).

1.14 Sistema circulatorio en insectos

El sistema circulatorio de los insectos es abierto, en el cual los órganos son bañados directamente por la hemolinfa que ocupa la cavidad del cuerpo (hemocel). La hemolinfa circula principalmente por la actividad de la arteria dorsal que se abre longitudinalmente en el hemocel (Chapman., 2012) El hemocel se divide en tres senos principales; un seno pericárdico dorsal, un seno perivisceral y un seno ventral (Chapman., 2012). Los senos paranasales están separados del seno visceral por el seno dorsal y los diafragmas ventrales. En la mayoría de las especies, el seno visceral ocupa la mayor parte de la cavidad corporal. Salvo excepciones, los insectos poseen solo un vaso sanguíneo dividido en cámaras. La zona posterior de este vaso se denomina corazón y está dotado de varias aberturas laterales llamadas ostiolos, que permiten la entrada de hemolinfa. La parte anterior del vaso se llama aorta y consiste en un tubo recto y sin válvulas (Chowanski *et al.*, 2016). El corazón aspira la hemolinfa de la cavidad abdominal y la propulsa hacia la cabeza, a través de la aorta, desde donde vuelve a filtrarse por los tejidos hacia la cavidad abdominal (**Figura 1.6**). En algunos insectos existen bombas accesorias destinadas a irrigar las patas, las alas o las antenas. La hemolinfa de *R. prolixus* sigue este curso general. (Chapman., 2012)

La sístole es la fase de contracción de los músculos intrínsecos de la pared del corazón, del que resultan los latidos. La diástole es la fase de expansión, cuando la hemolinfa entra en el corazón, resulta de la relajación del corazón y de los músculos asistidos por filamentos elásticos. En *R. prolixus* la diástole se completa por los músculos alares (Chiang *et al.*, 1990). Después de la diástole hay una tercera fase en el ciclo cardíaco conocida como diástasis en que el corazón permanece en estado expandido. Los aumentos en la frecuencia del latido del corazón se correlacionan con reducciones en el periodo de diástasis.

La frecuencia de las contracciones varía entre especies. Además, la frecuencia de latidos depende del estadio del desarrollo en que se encuentre el insecto. En general la frecuencia es mayor en ninfas de estadios más tempranos respecto de estadios más próximos al adulto. Existen factores ambientales que influyen la tasa de contracciones. La actividad por lo general se detiene por encima de 45-50 ° C y por debajo de 1-5 ° C (Chapmal., 2012).

La actividad del corazón es básicamente miogénica y puede ser modulada neuronal u hormonalmente. Los nervios segmentarios que llegan al corazón contienen las terminales de axones neurosecretores, por lo que sus secreciones podrían ejercer un efecto modulador. Además, las hormonas liberadas en la hemolinfa son conocidas por regular el proceso de contractibilidad en corazón. Los péptidos cardioregulatorios son producidos en células neurosecretores en la ganglia del cordón ventral nervioso y liberado a la hemolinfa a los órganos periviscerales.

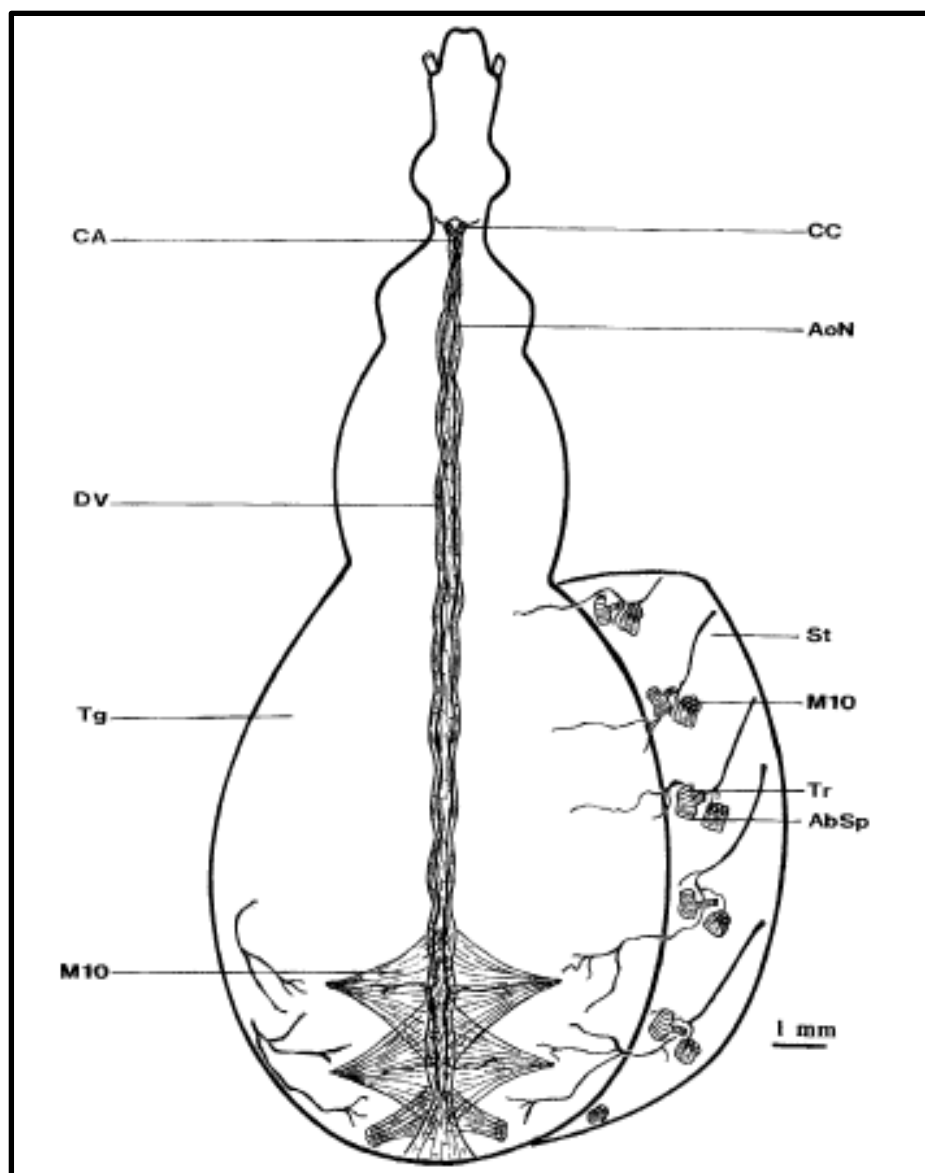


Figura 1.8: Vista dorsal de la aorta, músculos alares y espiráculos con sus innervaciones. Imagen extraída de Insausti, 1994.

1.14.1 Péptidos con acción miotrópica

Péptido cardioactivo de crustáceos (CCAP). El péptido cardioactivo de crustáceos (CCAP) fue aislado por primera vez de los órganos pericárdicos del cangrejo de tierra *Carcinus maenas* por Stangier, Hilbich, Beyreuther y Keller (Stangier *et al.*, 1987). En insectos, se ha demostrado su localización en células de sistema nervioso central y se ha encontrado inmunoreactividad positiva en el cordón ventral nervioso, nervios cardíacos laterales que se proyectan al vaso dorsal, nervios segmentarios que se proyectan a aorta y

corazón, músculos alares, glándulas salivales, intestino anterior y posterior y órganos neurohemales (neurosecretores) de tórax y abdomen.

La función biológica más conocida es el aumento de la frecuencia de contracciones, siendo un potente agente cardioregulador. En *R. prolixus*, el aumento de la frecuencia cardíaca se observa a una concentración de 10^{-11} M del péptido, siendo variable en otras especies de insectos. Se encontró que la tasa de contracción, posterior a la estimulación con el péptido, se ve aumentada en un 25% en *D. melanogaster* y un 380 % en *R. prolixus*. CCAP produce efectos inotrópicos positivos (aumento de la fuerza de las contracciones del corazón). Debe destacarse que en los bioensayos *in vivo*, CCAP no afecta la función del corazón o tendría un efecto cronotrópico ligeramente positivo (Slama *et al.*, 2006)

Previo y durante la ecdisis y muda se ha detectado un aumento en la expresión de CCAP en *An. gambiae* (Estevez-Lao *et al.*, 2013), *C. maenas* (Stangier *et al.*, 1987), *Orconectes limosus* (Phlippen *et al.*, 2000) y *R. prolixus* (Lee *et al.*, 2013).

Proctolina. Su función miotrópica fue descrita por primera vez a partir de extractos viscerales aislados de la cucaracha *Peripleta americana*. Su localización fue identificada en sistema nervioso central, tracto digestivo y oviducto. Se ha observado que influencia la frecuencia y amplitud de las contracciones de corazón *in vitro*, y se han descrito efectos cronotrópicos positivos e inotrópicos negativos (Szeszel-Fedorowicz *et al.*, 2001).

El gen *RhoprPRL* fue identificado, clonado y secuenciado; codifica un péptido conservado y tres espaciadores. Ensayos de inmunohistoquímica (IHQ) revelaron la expresión de proctolina en células que forman racimos bilaterales a lo largo del SNC (Orchard *et al.*, 2011). Se identificó un GPCR en el genoma de *R. prolixus* mediante búsquedas por homología y análisis filogenéticos, pero no fue detectado en un transcriptoma del SNC (Ons *et al.*, 2016). PRL estimula las contracciones del intestino posterior, el intestino medio anterior y el corazón *in vitro* (Orchard *et al.*, 2011).

Hormona Adipokinética. La hormona adipokinética (AKH) se sintetiza y almacena en las células neurosecretoras que se localizan en *corpora cardiaca*. Se describió su actividad cardioaceleradora en *P. americana* (Scarborough *et al.*, 1984) y posteriormente se corroboró esta función en el escarabajo *T. molitor*, en la mosca *D. melanogaster* (Noyes *et al.*, 1995), en la cucaracha *Blaberus discoidalis* (Keeley *et al.*, 1991) y en el insecto palo *B. extradentatum* (Malik *et al.*, 2012). En *R. prolixus* se estudió el efecto de

RhoprAKH sobre el corazón mediante ensayos *in vitro*, pero no se observaron variaciones de la frecuencia cardíaca (Patel *et al.*, 2014).

En el insecto *T. molitor*, se demostró que extractos del complejo *corpora cardiaca/corpora allata* inducen efectos cronotrópicos positivos e inotrópicos negativos (Chowanski *et al.*, 2016).

En el estudio de análogos sintéticos para AKH, se logró determinar que esta bioactividad está condicionada por la amidación peptídica, dado que el péptido no amidado no aumentó la frecuencia cardíaca en *B. extrudentatum* (Malik *et al.*, 2012).

No se ha reportado una función de AKH en la contractilidad intestinal (Malik *et al.*, 2012).

FRMamida. La función cardioexcitatoria de FRMamida se reportó por primera vez en *Macrocallista nimbosa* (Price e Greenberg, 1977). En larvas del mosquito *An. gambiae* cuando fueron tratadas con el tetrapéptido FMRFamida se observó un aumento en la frecuencia cardíaca del mosquito adulto de manera dosis y tiempo dependiente (Hillyer., 2012). Del mismo modo, la propiedad cardioaceleradora (efectos positivos crono- e ionotrópicos) se observó en la mosca azul *Calliphora vomitoria* (Chowanski *et al.*, 2016).

Bioensayos *in vivo* en *D. melanogaster* mostraron que FMRFamida no tuvo ningún efecto sobre la frecuencia cardíaca del adulto y la pupa, a pesar de esto se encontró que algunos análogos peptídicos con su región amino terminal extendida disminuyeron significativamente el número de latidos cardíacos tanto en pupas como en adultos (Chowanski *et al.*, 2016).

En *R. prolixus* se ha detectado inmunoreactividad positiva para este péptido en SNC y en las inervaciones que rodean estructuras reproductivas, tales como oviducto, espermateca y bursa. Los ensayos *in vitro* demostraron un papel de *RhoprFLP* en la estimulación de contracciones espontáneas de ovariolas, ovarios, oviductos y bursa apuntando a un papel en la ovulación y la oviposición en esta especie (Sedra e Lange, 2014).

Miosupresina. La identificación del péptido miosupresina, Leuma-MS (pQDVDHVFLRFa), se realizó en extractos de cabeza de la cucaracha *L. maderae*; en función de la capacidad del péptido para disminuir la frecuencia de contracciones espontáneas del intestino posterior (Holman *et al.*, 1986). El mismo decapeptido se ha aislado de otras especies de insectos, incluidas las langostas *S. gregaria* (Robb *et al.*,

1994) y *L. migratoria* (Peeff *et al.*, 1993) las moscas *Neobellieria bullata* (Fonagy *et al.*, 1992) *D. melanogaster* (Nichols., 1992), *Haematobia irritans* y *S. calcitrans* (Meola *et al.*, 1996). Este neuropéptido se ha encontrado, en insectos, en el complejo *corpora cardiaca* / *corpora allata* de *T. castaneum* (Li *et al.*, 2008), los tejidos neurohemales de *T. molitor* y el complejo cerebro y retrocerebral de *Z. atratus* (Marciniak *et al.*, 2010). La mayoría de las miosupresinas identificadas son decapeptidos, pero la secuencia activa es un heptapéptido. Generalmente, las miosupresinas actúan como mioinhibidores. Reprimen las contracciones espontáneas en recto, oviducto y conducto eyaculador. *In vitro*, también afectan la contractilidad del corazón. En *M. sexta*, se observó inhibición de la frecuencia cardíaca a una concentración de 5×10^{-6} M. En *D. melanogaster* se reportaron efectos cronotrópicos negativos en pupas, el péptido Drome-MS redujo significativamente el ritmo cardíaco.

En *R. prolixus* se observó que *RhoprMS* inhibe la frecuencia cardíaca (Lee *et al.*, 2012; Leander *et al.*, 2015) y la amplitud y frecuencia de contracciones espontáneas del intestino medio anterior y el intestino posterior (Lee *et al.*, 2012). Además, dosis relativamente altas de *RhoprMS* aumentan el tono basal y tienen efecto en la amplitud de las contracciones del oviducto en *R. prolixus* (Sedra *et al.*, 2015). A través de modelos de interacción ligando-receptor, fueron diseñados un agonista y un antagonista de *RhoprMS*; se confirmó su función mioinhibitoria a través de bioensayos de frecuencia cardíaca (Leander *et al.*, 2015).

Pirokininas. Las piroquininas (PK) contienen el pentapéptido C-terminal común FXPRLa (X = S, T, G o V); su extremo N-terminal está bloqueado por piroglutamato. El primer péptido de esta familia fue aislado en 1986 a partir de extractos de cabeza de la cucaracha *L. maderae*, con actividad mioestimuladora en recto. Además, producen incremento de la contractilidad en el intestino anterior, el intestino medio y el oviducto en *P. americana* y *L. migratoria* (Audsley e Weaver, 2009). Afectan los latidos del corazón, con efectos diversos según la especie. Por ejemplo, en *D. melanogaster*, la aplicación de Drome-PK-2 en ensayos *in vitro* condujo a un aumento dosis dependiente de la frecuencia cardíaca. En *Z. atratus* se demostró que Zopat-PK-1 tiene un leve efecto cardioestimulador (20%) y la aplicación de Tenmo-PK-2 en *Z. atratus* una inhibición de las contracciones (70% de inhibición a una concentración del péptido de 10^{-5} M). Estos datos sugieren que diferentes PKs desempeñan diferentes roles en la regulación de las

actividades del corazón dada la activación diferencial de distintas vías de receptores involucrados en la transducción de señales (Marciniak *et al.*, 2010).

En *R. prolixus* no se ha descrito ninguna función hasta el momento para este neuropéptido (Ons, 2017).

Corazonina. El péptido Corazonina fue identificado en *P. americana*. Es sintetizado en células neurosecretoras de la corpora cardiaca. Su función cardioaceleradora ha sido descrita en distintas especies de cucarachas y en *R. prolixus*. El gen precursor *RhoprCRZ* codifica un péptido altamente conservado en los insectos con la secuencia QTFQYSRGWTN-amida (Ons *et al.*, 2011). Una forma piroglutámica (piro-QTFQYSRGWTN-amida) se detectó por MS / MS en cerebro y hemolinfa de *R. prolixus* (Ons *et al.*, 2009, 2011). A través de inmunohistoquímica se detectó reactividad en un grupo de células mediales emparejadas de cerebro que se proyectan a las células de CC y LANS a (Patel *et al.*, 2014). También se detectó en el transcriptoma de testículo (Ons 2017). Los análisis bioinformáticos y filogenéticos revelaron la secuencia de un posible receptor de *RhoprCRZ* (Ons *et al.*, 2016).

Péptidos mioinhibitorios/Alostatinas (MIP/ASTs). Estos neuropéptidos muestran efectos inhibitorios de la contracción muscular. Se ha demostrado su actividad alostática, clasificándolos como allatostatinas, en el insecto *Gryllus bimaculatus* (Lorenz *et al.*, 1995). MIP / ASTs, conocidas como allatostatinas tipo B, se identificaron en langostas, grillos, cucarachas, insectos palo, moscas y *R. prolixus*. El primer péptido en esta familia, Locmi-MIP (AWQDLNAGWa), se identificó en *L. migratoria*, como inhibidor de las contracciones en el oviducto y recto. Varios péptidos de este grupo también inhiben la síntesis de ecdisteroides, la contractilidad del intestino y la ingesta de alimentos en insectos (Chowański *et al.*, 2016). Todos los péptidos que pertenecen a la familia MIP / AST se caracterizan por una secuencia W (6X) W o W (7X) W en el extremo C - terminal (Ons.,2017) e interactúan con los receptores acoplados a la proteína G (Coast, 2011; Ons.,2017). Se ha demostrado que los MIP / AST tienen propiedades cardiovasculares en el corazón de escarabajo (Lubawy *et al.*, 2003). Los experimentos *in vitro* en los corazones de *T. molitor* demostraron que Grybi-MIP-1 (GWQDLNKGWa) tenía efectos cardiotrópicos a altas concentraciones (10^{-5} M), produjo una reducción en la fuerza de las contracciones (efecto inotrópico negativo), pero no tuvo efecto en la frecuencia de estas (Chowański *et al.*, 2016).

El gen *RhoprMIP* (también llamado allatostatina-B) codifica once neuropéptidos putativos maduros, ocho de los cuales son péptidos centrales (Ons *et al.*, 2011). A través de espectrometría de masas en tándem se confirmó la expresión de los ocho péptidos amidados centrales y un péptido espaciador (Ons *et al.*, 2009, 2011; Sterkel *et al.*, 2011). En *R. prolixus*, se detectó por inmunohistoquímica en células emparejadas bilateralmente de cerebro y ganglios del SNC, en regiones neurohemales como ABN y CC, recto, sistema reproductivo masculino y femenino (Lange *et al.*, 2012). Recientemente, se caracterizaron dos isoformas de GPCR; su expresión se produce principalmente en el SNC, glándulas salivales y estructuras reproductivas masculinas y femeninas (Paluzzi *et al.*, 2015). Varios estudios informaron diferentes funciones para MIP en insectos, incluida la inhibición de la producción de hormonas juveniles (Lorenz *et al.*, 1997), supresión de la ecdisteroidogénesis (Kim *et al.*, 2010) y la regulación de la ecdisis (Zitnan e Adams, 2012). En *R. prolixus*, los ensayos *in vitro* confirmaron un efecto mioinhibitorio de los péptidos *RhoprMIP* en el oviducto y el intestino posterior (Lange *et al.*, 2012; Sedra *et al.*, 2015).

En la primera parte del presente trabajo de Tesis se estudiaron aspectos de la resistencia a insecticidas causada por mutaciones *kdr* en *T. infestans*, y ensayos de detección de mutaciones, como herramienta de detección temprana para el monitoreo y manejo de resistencia. En una segunda parte, se estudió el papel fisiológico de neuropéptidos utilizando como modelo a *R. prolixus*. Debido a su relevancia en la fisiología de triatomíneos, y en la transmisión de *T. cruzi*, nos centramos en el estudio de la regulación del proceso de diuresis. Además de su interés en la comprensión de procesos fisiológicos en insectos, los estudios relativos al sistema neuroendocrino de especies de importancia sanitaria aportan información que podría ser útil en la búsqueda de nuevos blancos de insecticida. Esto último tiene como objetivo el complementar los compuestos existentes. El uso de estrategias alternativas podría colaborar a un manejo integrado, que permita extender la vida útil de los neurotóxicos, y ofrecer opciones más seguras para el medio ambiente y la salud humana.

2. Objetivos Generales

2. Objetivos Generales

- *Profundizar en el conocimiento de la genética de la resistencia a insecticidas piretroides por parte de Triatoma infestans, principal vector de Chagas en Argentina, en particular la implicación de mutaciones en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje.*
- *Aportar conocimiento y herramientas para el manejo de resistencia a insecticidas piretroides en T. infestans y para el control integrado de triatomíneos, como desafío fundamental en el control de la enfermedad de Chagas.*
- *Generar conocimiento acerca del papel fisiológico de neuropéptidos, de interés en entomología básica y con posible aplicabilidad en la búsqueda de nuevos blancos de insecticidas.*

3. Resultados

3.1 Capítulo 1. Resistencia a insecticidas piretroides en *T. infestans* e implicancia de las mutaciones *kdr* en el canal sodio dependiente de voltaje.

Hipótesis:

Se plantea que la resistencia a insecticidas piretroides en poblaciones de *T. infestans* situadas en el área geográfica del Gran Chaco está asociada a la ocurrencia de mutaciones en el dominio II del canal de sodio dependiente de voltaje, y que el diseño y perfeccionamiento de ensayos moleculares de detección de estas mutaciones es de utilidad para el monitoreo y manejo de la resistencia a piretroides en *T. infestans*.

Objetivos específicos del Capítulo 1:

- Conocer las variantes alélicas para la región IIS4-IIS6 del gen del canal de sodio dependiente de voltaje TiNa_v existentes en distintas poblaciones de *T. infestans* resistentes.
- Optimizar y evaluar la sensibilidad del ensayo de digestión diferencial por una endonucleasa de restricción (*Restriction Endonuclease Assay*; REA) para la detección de la mutación *kdr* L925I.

3.1.1 Introducción

El trabajo que se describe en este capítulo se centra en la búsqueda de variantes alélicas presentes en la región IIS4-IIS6 del gen del canal de sodio dependiente de voltaje de *T. infestans* (TiNa_v) sitio de ocurrencia de numerosas mutaciones asociadas a resistencia a piretroides. En trabajos previos de nuestro laboratorio se logró secuenciar el dominio II completo del gen del canal TiNa_v (Fabro *et al.*, 2012). Inicialmente, identificamos una mutación puntual en el gen (sustitución de una adenina por una timidina), que generaba una sustitución aminoacídica de Leu por Fen en la posición 1014, asociada a una población de alta resistencia (RR 35,7) de la Provincia de Salta, localidad de Madrejones (Fabro *et al.*, 2012). De esta manera reportamos la primera mutación *kdr* en triatominos.

Frente a otro foco de altísima resistencia (*resistance ratio* (RR)=1030) en la localidad de El Malá, Provincia de Chaco, un estudio comparativo de la secuencia del dominio II de TiNav reveló la existencia de una segunda mutación puntual asociada a la población resistente (Capriotti *et al.*, 2014). Esta mutación ocurre por la sustitución de una adenina por una citosina en la secuencia nucleotídica, lo cual produce el cambio de Leu a Ile en la secuencia de aminoácidos en la posición 925 (L925I). Esta mutación se encuentra localizada en un bucle intracelular del canal de sodio, entre los segmentos transmembrana IIS4 y IIS5 (Usherwood *et al.*, 2007). A diferencia de la mutación L1014F, L925I es poco usual como mutación *kdr* (Morin *et al.*, 2002; Alon *et al.*, 2006; Roditakis *et al.*, 2006; Karatolos *et al.*, 2012). Los ensayos electrofisiológicos *in vitro* en oocitos de *X. laevis* han demostrado que esta mutación disminuye significativamente la potencia de los piretroides (Usherwood *et al.*, 2007).

La aplicación de estrategias de monitoreo y manejo de resistencia a insecticidas resulta de importancia crucial para el éxito de las campañas de control de plagas a mediano plazo. Sus objetivos son detectar la resistencia en el nivel más bajo posible, a fin de evitar que el proceso de selección de individuos resistentes continúe. Para conseguirlo, se requiere desarrollar herramientas relativamente sencillas, económicas y factibles en ensayos de monitoreo de resistencia a campo, con el objetivo de identificar tempranamente la presencia, la abundancia y la dispersión de individuos resistentes. La ventaja de los métodos moleculares por sobre las técnicas toxicológicas es que éstas últimas no permiten una detección temprana, antes de que la resistencia se haya generalizado e instalado en una población. Por su parte, los métodos moleculares permiten detectar la presencia de la mutación aún en heterocigosis, cuando los individuos no resultan resistentes, pero sí posiblemente lo sea su descendencia. La rotación de compuestos se plantea como una estrategia para evitar la dispersión y fijación de resistencia, así como para prolongar la vida útil de los insecticidas. La asociación de polimorfismos con resistencia, y el desarrollo de métodos moleculares para detectarlos, pueden constituirse como herramientas que permitan detectar a tiempo el surgimiento de resistencia, y por tanto planificar las estrategias de rotación de insecticidas con sitios de acción alternativos.

Tanto para la mutación L1014F como para la mutación L925I hemos diseñado ensayos moleculares basados en PCR (Fabro *et al.*, 2012; Capriotti *et al.*, 2014). En el caso de L925I, el ensayo se basa en la digestión diferencial por una enzima de restricción: *Restriction enzyme assay* (REA) (Capriotti *et al.*, 2014) (Patente en trámite número

P2012010311). Se aprovecha el hecho de que el cambio de base citosina por adenina suprime un sitio de restricción para la endonucleasa SacI. En los individuos portadores de la mutación de resistencia, la secuencia GAGCTC en el gen cambia por GAGCTA, y por lo tanto no es clivada por SacI (**Figura 3.1.1.**).



Figura 3.1.1: Sitio de ocurrencia de la sustitución (C => A) en la secuencia nucleotídica del canal de sodio dependiente de voltaje de *T. infestans*.

Esta característica fue aprovechada para el desarrollo de una técnica relativamente simple a fin de detectar la presencia o ausencia de la mutación L925I. A partir de ADN genómico de *T. infestans* se amplifica un fragmento específico, y los productos de PCR son digeridos con SacI (Capriotti *et al.*, 2014). En el caso de las poblaciones portadoras de polimorfismo asociado a susceptibilidad, se espera que el amplicón sea digerido. Si la muestra posee la mutación asociada a resistencia el amplicón no será digerido. Este ensayo molecular podría ser una herramienta que habilite la detección temprana de dispersión y surgimiento de nuevos focos de resistencia, al permitir detectar la presencia de la mutación L925I en insectos individuales incluso en heterocigosis. En la **Figura 3.1.2** se muestra una imagen a modo de ejemplo.

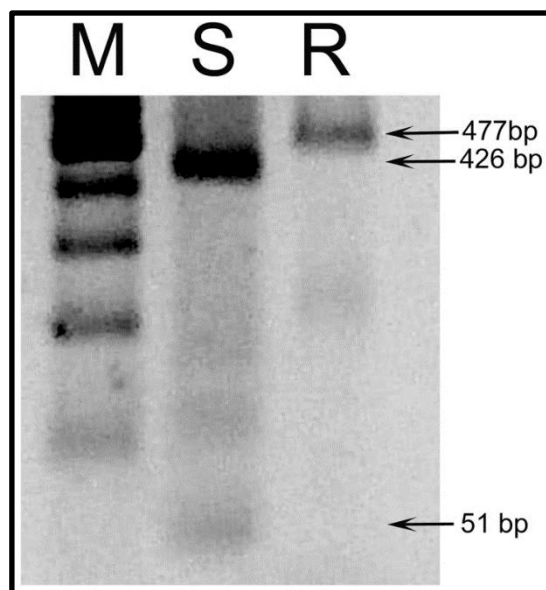


Figura 3.1.2: Ensayo para la detección de la mutación L925I en insectos individuales. La mutación suprime un sitio de escisión para la endonucleasa de restricción Sac I. (Capriotti *et al.*, 2014)

En este capítulo se describen mutaciones silenciosas en el dominio II del canal TiNav que están asociadas a una población resistente de Chaco portadora de la mutación L925I. Además, se realizó una evaluación de la sensibilidad y una optimización del ensayo molecular *REA* y se hizo una estimación de frecuencias de la mutación L925I en poblaciones de *T. infestans* con distintos niveles de resistencia provenientes del Gran Chaco. Los resultados revisten importancia dentro de los objetivos prioritarios de comprender el fenómeno de resistencia a insecticidas piretroides en *T. infestans*, y el necesario manejo de resistencia dentro de las campañas de control primario de Chagas.

3.1.2 Resultados

3.1.2.1 Genotipificación del dominio II del canal de sodio dependiente de voltaje en poblaciones de *T. infestans* susceptibles y resistentes a piretroides

El análisis de secuencias de insectos provenientes de una población susceptible (S) y otra resistente (R) a piretroides reveló que todos los clones de la cepa S muestran la secuencia de tipo *wild type* (número de acceso de GenBank KF179338) (**Figura 3.1.3**).

Por el contrario, en todos los clones individuales correspondientes a la población de El Malá (RR>1000) está presente una única sustitución nucleotídica no silenciosa (número de acceso a GenBank KF179339) que origina la mutación *kdr* L925I. Además, dos cambios de pares de bases silenciosos adicionales están fuertemente asociados con la cepa resistente (**Figura 3.1.3**); una sustitución de timidina a citosina en el par de bases 318 (ambos codones que codifican el aminoácido Fen) y una inserción de una timidina en el par de bases 492 (dentro de la secuencia intrónica). Por otra parte, existen individuos portadores de otras mutaciones silenciosas que no están asociadas a una de las dos poblaciones (**Figura 3.1.3**). Esto podría indicar que la mutación no surgió recientemente, o que ocurrieron eventos de surgimiento paralelos.



Figura 3.1.3: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de un fragmento del canal de sodio dependiente de voltaje de *T. infestans*. Se muestran las secuencias de clones de poblaciones sensibles (S) y resistentes (R). Las bases idénticas a las del clon S1 se indican con *. Se detecta una sola sustitución no silenciosa en la posición 52 de la secuencia (señalada con la caja), para cada clon individual de la población R. (Capriotti *et al.*, 2014).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3900400/figure/pntd-0002659-g001/>

3.1.2.2 Presencia de la mutación *kdr* L925I en poblaciones de Gran Chaco

Realizamos los ensayos de detección de mutaciones en insectos provenientes de distintas localidades del Gran Chaco, todas ellas con distintos niveles de resistencia a insecticidas piretroides. El ensayo REA determinó la presencia de la mutación L925I en las poblaciones de la Provincia argentina de Chaco: La Esperanza, Juramento y El Mala (Figura 3.1.4) (Capriotti *et al.*, 2014; Sierra y Capriotti., 2016). Por otra parte, no se encontró la mutación L925I en las poblaciones de La Gerónima, Madrejones, Pampa Grande, Tierras Nuevas, Villa del Carmen ni Yacuiba. En estas tres últimas (ubicadas en el Norte de Salta y Sur de Bolivia) en cambio sí se observó la mutación *kdr* L1014F (Sierra y Capriotti., 2016). En cada caso, el fragmento de 572 pb amplificado fue pirosecuenciado a fin de corroborar la presencia de la mutación en esta posición y valorar la eficiencia y posible tasa de error de los ensayos. En todos los casos los resultados de la secuenciación coincidieron con lo determinado con los métodos basados en PCR.

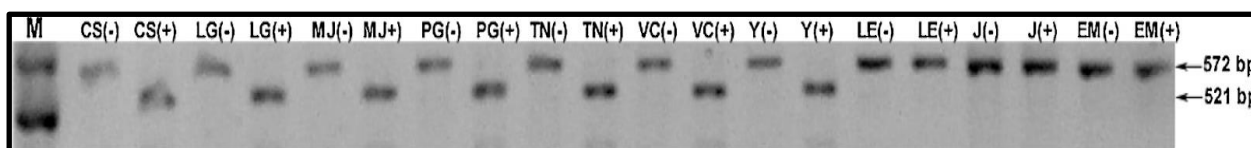


Figura 3.1.4: Ensayo REA en poblaciones de *T. infestans* caracterizadas como resistentes. Se observan los productos de digestión con la enzima Sac I. El fragmento de 521 pb indica la presencia del alelo susceptible. El fragmento de 572 pb indica la presencia del alelo asociado a resistencia. M: Marcador de peso molecular, CS: Control sensible; LG: La Gerónima; MJ: Madrejones; PG: Pampa Grande; TN: Tierras Nuevas; VC: Villa El Carmen; Y: Yacuiba; LE: La Esperanza; J: Juramento; EM: El Malá. -: Muestra no tratada con SacI. +: Muestra tratada con SacI (Sierra y Capriotti., 2016).

3.1.2.3 Determinación de sensibilidad del ensayo REA.

Una vez que determinamos que el ensayo REA resultó eficiente y confiable para detectar la mutación L925I en distintas poblaciones del área del Gran Chaco, procedimos a estudiar su sensibilidad en términos del nivel mínimo de detección. Se amplificó por PCR el fragmento de 572 pb del gen *TiNa_v* a partir de ADN genómico extraído de dos poblaciones: Pampa Grande (*wild type*) y El Juramento (mutante L925I). Los productos de PCR obtenidos para cada población se insertaron en el plásmido pGEM-T. Posteriormente se procedió al clonado y obtención del ADN plasmídico con el inserto. El

genotipo de 5 clones por población se confirmó mediante el ensayo de REA. Utilizando muestras de genotipo conocido, ya sea a partir de ADN plasmídico o genómico, se analizó la tasa de falsos positivos REA para muestras homo y heterocigotas. Una vez optimizadas las condiciones de PCR como se ha descrito anteriormente, no se obtuvieron resultados falsos positivos o falsos negativos, después de más de 30 réplicas para cada prueba.

Se estudió el límite inferior de detección del ensayo REA, ajustándose a un conjunto de mezclas de molde de ADN plasmídico de composición conocida, para contener una concentración creciente de ADN con la mutación L925I. En las condiciones ensayadas, el límite de detección inferior para el polimorfismo L925I con REA es del 5% (**Figura 3.1.5**). Por lo tanto, los insectos podrían ser mezclados en grupos de hasta un máximo de 10, y analizados con REA en ensayos individuales, y aún podría detectarse fácilmente la presencia de un individuo heterocigota. Esta posibilidad aumenta la procesividad de los ensayos y su relación eficiencia/costo respecto a analizar insectos individuales.

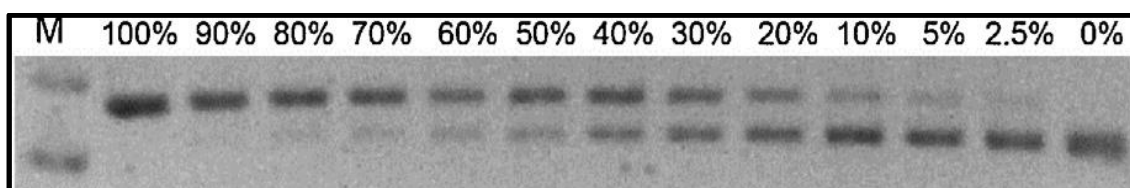


Figura 3.1.5: Determinación de sensibilidad para el ensayo REA.

M: Marcador de peso molecular. Los números superiores indican el porcentaje del alelo de resistencia en cada muestra. Se observa cómo a medida que aumenta la concentración del alelo sensible la banda de 572 pb comienza a digerirse. El kit REA estaría detectando una proporción alélica de 9,25 partes del alelo sensible y 0.25 partes de alelo L925I, lo que significa que detecta 2.25 insectos resistentes entre 100 insectos sensibles (Sierra y Capriotti., 2016).

3.1.2.4 Estimación de frecuencias de mutaciones en poblaciones del Gran Chaco

Los resultados obtenidos a través de la implementación del ensayo REA y posterior confirmación por secuenciación dan la pauta de que este método puede utilizarse de forma confiable en un amplio rango de poblaciones. Consecuentemente, se utilizó para estimar la frecuencia de la mutación L925I en las distintas poblaciones, y evaluar la correlación entre la frecuencia de la mutación y la tasa de resistencia en cada caso.

Se encontró que el polimorfismo asociado a resistencia L925I está ausente en todos los individuos analizados de las poblaciones de alta resistencia de la frontera argentino – boliviana: Madrejones, Tierras Nuevas, Villa del Carmen ni de resistencia moderada-baja (Pampa Grande y La Gerónima, ambas localizadas en la Provincia de Chaco).

La mutación *kdr* L925I se encontró en la totalidad de los individuos analizados de la población de La Esperanza. En la población El Juramento se encontró en una frecuencia muy alta (0,93), al igual que en la población de El Malá (0,9). Todas las anteriores sob poblaciones de muy alta resistencia provenientes de la Provincia de Chaco. En la **Tabla 3.1.1**, se muestran los resultados de la estimación de frecuencias de polimorfismos para cada población.

Población	Provincia /Departamento	País	Año de colecta	Generación laboratorio	RR Deltametrina	RR Fenitrothion	Frecuencia alélica		Total (N)
							I925	L925	
Madrejones	Salta	Argentina	2008	F3	35.7 (27.03–47.62) a)	ND/Extinta	0	1	10
Tierras Nuevas	Tarija	Bolivia	2006	F12	541.6 (260.2–1127.3) b)	0.42 (0.23–0.76)	0	1	11
Villa del Carmen	Tarija	Bolivia	2006	F10	438.0 (147.5–1300.6) b)	0.95 (0.75–1.21)	0	1	9
Yacuiba	Tarija	Bolivia	2005	F11	154.4 (121.2–169.0) c)	0.79 (0.62–1.02) c)	ND	ND	0
Pampa Grande	Chaco	Argentina	2012	F2	2.08 (1.27–3.39)	1.45 (0.95–2.21)	0	1	10
La Esperanza	Chaco	Argentina	2011	F2	233.42 (116.8–466.6) d)	1.00 (0.75–1.33) d)	1	0	10
La Gerónima	Chaco	Argentina	2012	F2	5.51 (3.57–8.52)	1.2 (0.87–1.54)	0	1	5
El Juramento	Chaco	Argentina	2013	F2	> 2000	0.84 (0.58–1.20)	0,93	0,07	14
El Malá	Chaco	Argentina	2011	F3	1031 (909.1–1213.3) e)	2.75 (2.47–3.12) e)	0,9	0,1	11

a) Fabro et al. 2012; b) Germano et al. 2010; c) Santo Orihuela et al. 2008; d) Germano et al. 2014; e) Carvajal et al. 2012.
ND= No hay información. La población Yacuiba esta casi extinta y no fue posible evaluar la frecuencia alélica.

Tabla 3.1.1: Relación de tasa a resistencia a deltametrina y mutación L925I en poblaciones de *Triatoma infestans* de la región del Gran Chaco. Se muestran las frecuencias para el alelo *kdr* en nueve poblaciones de *T. infestans* del Gran Chaco.

3.1.3 Discusión

En sus inicios, la Iniciativa del Cono Sur (ICS) proponía la interrupción de la transmisión de Chagas, al asumir que las poblaciones domésticas y peridomésticas de *T. infestans* tenían escasa diversidad genética, y que las poblaciones selváticas solo se hallaban aisladas en la región de Cochabamba (Bolivia). Los datos, sin embargo, contradijeron estos supuestos (Cortez *et al.*, 2010). En 2009 se confirmó la existencia de colonias selváticas de *T. infestans* en Argentina y poblaciones caracterizadas como “morfo oscuros” en el Chaco argentino (Noireau, 2009). El análisis de estos insectos mostró altos niveles de variabilidad genética, y en los insectos selváticos se encontraron haplotipos ancestrales (Noireau, 2009).

Hacia 2010, los logros de ICS incluyeron la interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi* en Uruguay en 1997, en Chile en 1999, en Brasil en 2006, en la región oriental de Paraguay en 2008 y en las provincias peruanas de Tacna y Moquegua en 2009 y 2010 respectivamente (Dias *et al.*, 2002; Schofield *et al.*, 2006; OMS, 2015). Además, 19 de 21 países latinoamericanos involucrados lograron un 100% de detección de *T. cruzi* en bancos de sangre. En Uruguay y Chile, donde la transmisión por el vector principal se interrumpió en 1997 y 1999 respectivamente, y donde no existe un vector secundario de importancia epidemiológica, el riesgo de transmisión del vector ahora se considera insignificante. Sin embargo, la región del Gran Chaco es una excepción al éxito logrado en otras zonas (Silveira, 2000; Dias *et al.*, 2002; Gürtler *et al.*, 2007). Las estrategias de control han fallado y el actual escenario de descentralización de los servicios de salud, la pobreza rural crónica, la falta de apoyo y una financiación muy limitada para el control de vectores resultan en un serio desafío para el control sostenible de *T. infestans*. Varias áreas del Gran Chaco han sido objeto de intensos esfuerzos de control de vectores con fallas recurrentes (Gürtler *et al.*, 2007; Mougabure-Cueto e Picollo, 2015; Pessoa *et al.*, 2015).

Las abundantes poblaciones de *T. infestans* viven en los domicilios y en las estructuras peridomésticas de las casas rurales del Gran Chaco (gallineros, corrales de animales, etc.). En estas últimas, las formulaciones de piretroides mostraron una menor eficacia, probablemente debido a la ausencia de efecto residual persistente al aire libre (Gürtler *et al.*, 2005; Cecere *et al.*, 2006). La estrategia recomendada de repetir una aplicación de insecticida cada seis meses generalmente no se cumple en estas áreas por una serie de razones, incluida la infraestructura, el material y la disponibilidad de recursos

humanos, entre los principales problemas operacionales. En este contexto, las poblaciones residuales de triatominos pueden expandirse y eventualmente restablecer la transmisión vectorial de *T. cruzi* (Gürtler *et al.*, 2009). El surgimiento de poblaciones con moderados y altos niveles de resistencia a piretroides ha puesto en evidencia la necesidad de generar conocimiento acerca de los factores asociados a la resistencia a estos neurotóxicos, y de desarrollar nuevas herramientas para manejo de resistencia, como parte fundamental de las estrategias de control.

Los resultados de este capítulo demuestran que la mutación *kdr* L925I asociada con resistencia a insecticidas piretroides se encuentra extendida en la Provincia de Chaco, dentro de la ecoregión del Gran Chaco. Dos localidades de la provincia de Chaco (Argentina) exhibieron los niveles más altos de resistencia: EJ (RR > 2000) y EM (RR = 1031). Entre las poblaciones resistentes estudiadas hasta el momento, la mutación L925I ha correlacionado con los niveles más altos de resistencia, cuando se compara con poblaciones con mutación L1014F (Sierra y Capriotti., 2016).

Este trabajo, junto con el estudio de poblaciones de *T. infestans* en la frontera boliviano-argentina (Sierra y Capriotti., 2016), demuestra que la alta resistencia a piretroides siempre correlaciona con la presencia de una mutación *kdr*. Esto último sugiere que estas mutaciones son la causa principal de resistencia a piretroides por parte de *T. infestans* en la ecoregión del gran Chaco. Las diferencias en el grado de resistencia entre distintas poblaciones con una misma mutación, por otra parte, sugieren la existencia de mecanismos contributivos, algunos de los cuales han sido detectados en reportes recientes (Germano *et al.*, 2012; Fronza *et al.*, 2016; Grosso *et al.*, 2016; Calderón-Fernández *et al.*, 2017; Traverso *et al.*, 2017). Los niveles más altos de resistencia se determinarían por las alteraciones en el sitio de acción, y el aumento del metabolismo detoxificativo y la penetrancia cuticular reducida estarían involucrados como mecanismos contributivos o estarían asociados a bajos niveles de resistencia (Mougabure-Cueto e Picollo, 2015).

Es interesante remarcar que se dan dos focos diferenciados de ocurrencia de mutaciones: L925I en el Chaco argentino y L1014F en la frontera boliviano-argentina (Sierra y Capriotti., 2016). Los resultados obtenidos sugieren que la frecuencia de la mutación L925I es muy alta, cercana al 100% en algunos casos, en poblaciones provenientes de la provincia argentina de Chaco. Es necesario mencionar que en algunos casos el número de individuos que pudo analizarse fue bajo, con lo que los resultados deben considerarse como una estimación.

Para afrontar el problema de la resistencia, las estrategias de monitoreo en las áreas endémicas deben ser implementadas rápidamente. En este sentido, la contribución del presente trabajo es la validación del ensayo para la detección de la mutación L925I, asociada a la resistencia en diferentes poblaciones, y la determinación de su sensibilidad. Para un seguimiento eficiente de la resistencia y para detectar estas mutaciones puntuales en poblaciones de *T. infestans* sería necesario el procesamiento de cientos de insectos por región. Por lo tanto, se recomienda que el uso de un grupo de insectos por ensayo aumentaría el rendimiento de la reacción y reduciría los costos. El método presentado requiere de equipos básicos de laboratorio y habilidades técnicas de biología molecular simples. Las técnicas basadas en qPCR, como por ejemplo TaqMan o *High Resolution Melting*, podrían aumentar la sensibilidad y rapidez, aunque requeriría equipos y suministros más caros.

Siempre que se detecten mutaciones *kdr*, la alternancia racional de insecticidas podría contribuir a prevenir o retrasar la fijación de la resistencia, aumentando la vida útil de los compuestos. Las directrices actuales de la OPS determinaron que las poblaciones con $RR_{50} > 5$ (cinco veces mayor que las poblaciones de referencia) deben considerarse resistentes (OPS 2005; Pessoa *et al.*, 2015). Por encima de ese nivel de RR_{50} , las directrices de la OPS recomiendan: 1) investigar las fallas operacionales en las estrategias de control de vectores realizadas por el Programa de Control de la Enfermedad de Chagas (CDCP); 2) cambiar el insecticida usado para CDCP por otro con un mecanismo de acción diferente; y 3) continuar monitoreando el perfil de susceptibilidad de las poblaciones alteradas a través del tiempo. Por otro lado, las directrices de la OPS consideran que si una población de campo presenta $RR_{50} < 5$, el cambio en la susceptibilidad observado probablemente se deba a la variabilidad individual y, por lo tanto, las actividades de control podrían continuar con el mismo insecticida, aunque la adición de monitoreo de susceptibilidad es recomendable.

En Argentina y Bolivia, los insectos de diferentes localidades muestran resistencia cruzada a los piretroides evaluados, pero resultan ser susceptibles a posibles insecticidas con sitios de acción alternativos, como los organofosforados fenitrotión y malatión, y el carbamato bendiocarb (Picollo *et al.*, 2005; Santo-Orihuela *et al.*, 2008; Toloza *et al.*, 2008; Lardeaux *et al.*, 2010; Carvajal *et al.*, 2012; Depickere *et al.*, 2012; Germano *et al.*, 2012, 2013).

El control de los insectos vectores de *T. cruzi* requiere de un manejo integrado y de la aplicación de múltiples estrategias, que incluyan mejoras en las viviendas, medidas

de vigilancia/monitoreo y gestión medioambiental a largo plazo para reducir la dependencia de los insecticidas. Los resultados de este capítulo son relevantes en el contexto de las estrategias de manejo de la resistencia para el control de los vectores de Chagas en el Gran Chaco.

3.2 Capítulo 2. Screening funcional de neuropéptidos en la diuresis en *R. prolixus*.

Hipótesis:

Se propone que la regulación de la función diurética en triatomíneos implica la participación de factores hormonales como los neuropéptidos, alguno/s de los cuales no han sido identificados como péptidos involucrados en la diuresis hasta la fecha.

Objetivo específico del Capítulo 2:

- Mediante el ensayo de Ramsay, evaluar el posible efecto diurético o antidiurético de un subconjunto de neuropéptidos seleccionados de acuerdo a criterios previamente establecidos.

3.2.1 Introducción

La gran ingesta de sangre de los triatomíneos implica una rápida diuresis postprandial a fin de mantener el equilibrio osmótico e iónico, y de recuperar la movilidad para escapar de los predadores. Dada la relevancia de la excreción en triatomíneos para la transmisión de la *T. cruzi* y la conveniencia de *R. prolixus* como insecto modelo en fisiología de insectos, la diuresis en esta especie ha sido intensamente explorada desde los estudios pioneros de Simon Maddrell (Maddrell, 1964b; Maddrell e Gee, 1974; Maddrell e Gardiner, 1976; Maddrell *et al.*, 1988; Maddrell *et al.*, 1989; Maddrell, Herman, *et al.*, 1991; Maddrell, Whittembury, *et al.*, 1991; Maddrell *et al.*, 1993).

El agua y los iones de la sangre son absorbidos hacia la hemolinfa a través del intestino medio anterior. El fluido es transferido al lumen de los túbulos de Malpighi. El segmento superior (distal) del túbulo secreta un líquido que se modifica en el segmento inferior (proximal). La orina es finalmente expulsada por el ano. Alrededor del 50% del volumen ingerido se excreta durante las primeras 3 horas después de la alimentación. La

diuresis es mínima después de este período y hasta el siguiente evento de ingesta de sangre.

Madrell estableció que los procesos de transporte de iones y fluidos deben coordinarse con precisión. Los factores hormonales que afectan la excreción de túbulos de Malpighi afectan también la reabsorción en el intestino medio anterior. La diuresis y la anti diuresis en *R. prolixus* son controladas por serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT) y hormonas peptídicas (Coast, 2009; Coast *et al.*, 2010).

La **serotonina** es una hormona diurética en *R. prolixus*, liberada a la hemolinfa por los nervios abdominales (Orchard., 2016). La serotonina actúa a través del AMP cíclico para estimular al máximo la absorción de líquido en intestino anterior (Farmer *et al.*, 1981), la secreción de fluidos en la parte distal de los túbulos (Maddrell *et al.*, 1971) y la captación de K^+ en la parte proximal (Maddrell *et al.*, 1993b). La serotonina circulante aumenta de $\sim 7\text{nmol}^{-1}$ a 115 nmol^{-1} dentro de los 5 min. del inicio de la alimentación (Lange *et al.*, 1989), lo cual es suficiente para estimular al máximo el sistema. Solo después de 60 min. del inicio de la alimentación, los niveles de serotonina disminuyen ($\sim 20\text{nmol}^{-1}$) (Orchard., 2006).

En cuanto a los neuropéptidos, **RhoprCRF** es el péptido diurético más potente identificado hasta la fecha en esta especie. Los péptidos CRF de *L. migratoria* (Locmi-DH) y *Zootermopsis nevadensis* (Zoone-DH) estimulan la secreción máxima en el segmento distal de los túbulos de *R. prolixus* (Coast, 1996; Te Brugge *et al.*, 2002). Además, Zoone-DH estimula la absorción de líquidos en intestino anterior (Coast., 2009), pero no tiene efecto sobre la absorción de K^+ en la parte proximal del túbulo (Donini *et al.*, 2008). La actividad de serotonina y Zoone-DH en la parte distal del túbulo es idéntica y da como resultado un cambio en el potencial transepitelial (TEP) (O'donnell e Maddrell, 1984; Ianowski e O'donnell, 2001; Donini *et al.*, 2008), que produce la activación secuencial de canales apicales de Cl^- , de la ATPasa- H^+ de tipo V de membrana apical, y de un cotransportador $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ de la membrana basal. El resultado neto es un aumento masivo en el transporte de NaCl y KCl en el lumen y de agua obligada osmóticamente (Coast., 2009).

Otro neuropéptido asociado a la diuresis en *R. prolixus* es **RhoprCT-like DH** (aunque con una actividad mucho menos fuerte que *RhoprCRF*). *RhoprCT-like DH* causa un pequeño aumento en la tasa de secreción de los túbulos de Malpighi (Te Brugge *et al.*, 2005), y ningún efecto sobre la composición iónica del fluido secretado (Donini *et al.*, 2008) o sobre el movimiento del agua. Se observaron efectos de esta neurohormona al

aumentar la frecuencia de contracciones del intestino medio anterior y las glándulas salivales (Te Brugge *et al.*, 2005), y aumentar el AMP cíclico (AMPc) contenido del intestino medio anterior (Te Brugge *et al.*, 2009).

RhoprAT ha sido asociado a la diuresis de *R. prolixus*. Resultados *in vivo* demuestran que la cantidad de orina eliminada, la frecuencia de las ondas peristálticas del intestino anterior y la tasa de contracciones de la aorta disminuye en insectos previamente alimentados con un antisuero anti-AT, en comparación con los controles alimentados con solución salina o con el antisuero preadsorbido ("inactivado") (Villalobos-Sambucaro *et al.*, 2015; Villalobos-Sambucaro *et al.*, 2016).

La terminación de la diuresis en *R. prolixus* implica la actividad de una hormona peptídica, como se ha demostrado usando CAP2b de *Manduca sexta* (Manse-CAP2b). La misma actúa a través de GMP cíclico al reducir la secreción en la parte distal de los túbulos, parcialmente estimulados con serotonina (Quinlan *et al.*, 1997). El péptido nativo, **RhoprCAP2b** ha demostrado tener actividad antidiurética potente ($IC_{50} = 4 \text{ nmol l}^{-1}$) en túbulos parcialmente estimulados por 50 nmol l^{-1} serotonina (Paluzzi *et al.*, 2008). **RhoprCAP2b** también reduce la absorción de líquidos en el intestino medio anterior estimulado con serotonina o ZooneDH (Orchard e Paluzzi, 2009). La terminación de la diuresis depende de la potencia y tasa de respuesta del intestino anterior y de la parte distal del túbulo a **Rhopr-CAP2b**.

Muchos neuropéptidos de insectos aún no han sido caracterizados funcionalmente, mientras que para otros se han descrito distintas actividades en distintas especies, e incluso dentro de la misma especie (pleiotropismo) (Nassel *et al.*, 2010). En este apartado se presenta un *screening* de la actividad diurética o antidiurética para un conjunto de neuropéptidos, con el objetivo de detectar posibles nuevas moléculas con papel en la osmoregulación en *R. prolixus*. Además, para cada neuropéptido particular se evaluó el efecto en conjunto con serotonina ($1 \mu\text{M}$). Es sabido que la serotonina es un potente factor diurético de *R. prolixus*, que posee un marcado efecto en la secreción de los túbulos de Malpighi. Además, se ha demostrado que varias familias de neuropéptidos poseen actividad diurética de manera sinérgica entre otros neuropéptidos y/o con serotonina (Furuya *et al.*, 2000, Coast *et al.*, 2002).

La elección de los péptidos ensayados se basó en información previa disponible: se seleccionaron aquellos para los cuales existía algún indicio de una posible implicancia en la diuresis (como por ejemplo la expresión del precursor o el receptor en tejidos clave)

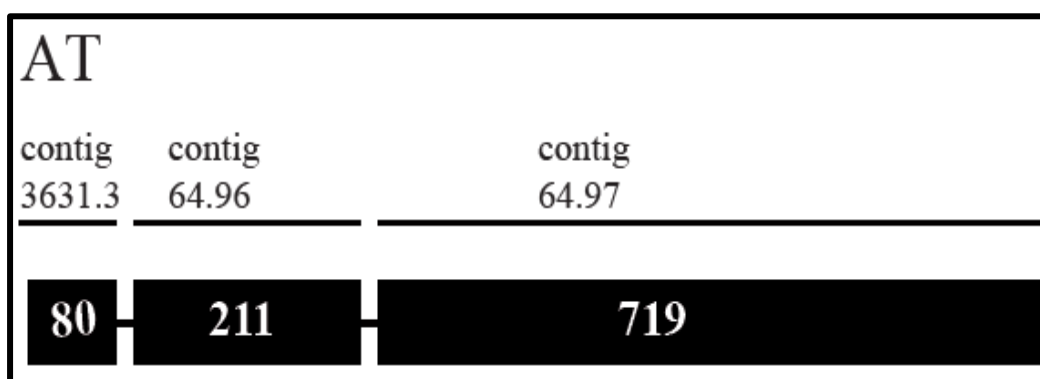
o cuyo papel fisiológico no había sido dilucidado, hasta el momento de los ensayos, en ninguna especie.

Como resultado del proceso de selección, los neuropéptidos ensayados por la técnica de Ramsay (ver Materiales y Métodos) fueron:

1) Alatotropina

El precursor de *RhoprAT* codifica una Alatotropina conservada (ATP) y dos péptidos espaciadores (**Figura 3.2.1 A**) (Ons *et al.*, 2011). Tanto el sistema nervioso central como las glándulas salivales y el intestino posterior presentaron inmunoreactividad para este neuropéptido (Masood y Orchard., 2014). La expresión de *RhoprAT* también se detectó en la base de datos transcriptómica en testículos. Se predijo un GPCR perteneciente a la familia A a partir de la secuencia genómica. La expresión de este receptor fue detectada por RT-PCR en el intestino medio anterior, el intestino posterior, túbulos de Malpighi y ovarios de adultos de *R. prolixus* (Villalobos-Sambucaro *et al.*, 2015), en forma posterior a la realización de los ensayos aquí presentados. El tratamiento con el neuropéptido aumentó la frecuencia de las contracciones de la aorta cuando el insecto fue pretratado con 5-HT, revelando un efecto sinérgico de ambas hormonas (Masood y Orchard, 2014; Villalobos-Sambucaro *et al.*, 2015). Resultados *in vivo* mostraron que la cantidad de orina eliminada, la frecuencia de las ondas peristálticas y la tasa de contracciones de la aorta disminuyen en insectos previamente alimentados con un antisuero anti-AT, en comparación con los controles alimentados con solución salina o con el antisuero inactivado. Estos resultados apuntan a un efecto diurético de *RhoprATP* (Villalobos-Sambucaro *et al.*, 2015). En la **Figura 3.2.1 B**) se indica la secuencia aminoacídica del péptido sintético ensayada.

A)



B)

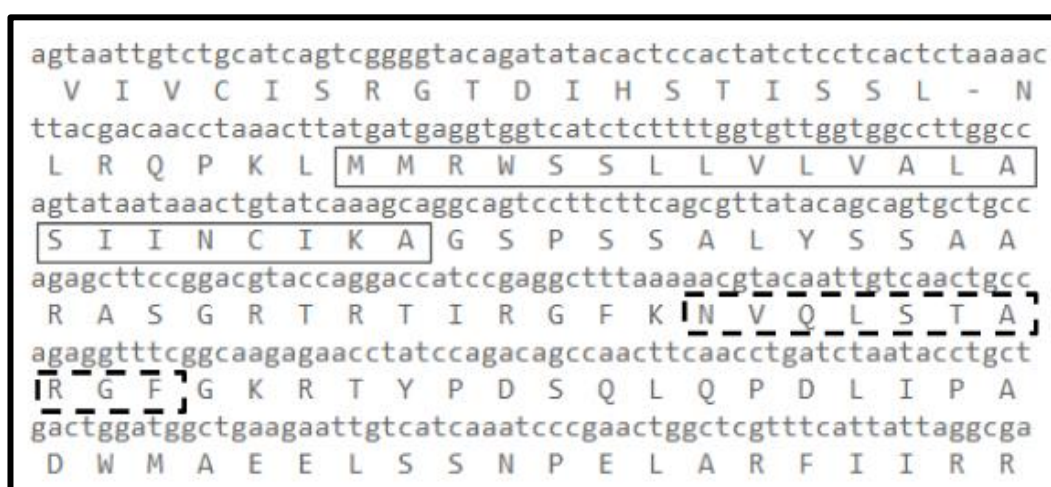


Figura 3.2.1. A) Estructura del gen precursor del neuropéptido de *RhoprATP* (Ons et al., 2011). Los números en cada exón (recuadros negros) indican su tamaño en nucleótidos. El número de Contig está indicado para cada exón o grupo de exones. Las líneas representan intrones. B) Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *RhoprATP*. El péptido señal se muestra en recuadrado. El péptido sintético utilizado se muestra en un recuadro negro de línea cortada.

2) Hormona Adipokinetica (AKH)

El gen precursor *RhoprAKH* codifica un péptido central y un péptido espaciador (**Figura 3.2.2 A**) (Ons et al., 2011). En *R. prolixus*, como en otros insectos, este precursor se expresa en células neurosecretoras de corpora cardiaca y se detectó en un transcriptoma de ovarios (Patel et al., 2014; Zandawala et al., 2015). En cuanto a su receptor se identificó un GPCR altamente expresado en cuerpo graso, moderadamente en el vaso dorsal, y con una baja expresión en el sistema nervioso central y tejido reproductivo femenino (Zandawala et al., 2015). La inyección del péptido sintético (Patel et al., 2014)

y el silenciamiento génico (Zandawala *et al.*, 2015; Alves-Bezerra *et al.*, 2016) indicaron un papel en la movilización de lípidos del cuerpo graso a la hemolinfa. La presencia del precursor y un receptor para *RhoprAKH* en tejidos reproductivos podrían sugerir un papel en la fisiología reproductiva.

En distintas especies de insectos, AKH se encuentra involucrada en la homeostasis de carbohidratos en hemolinfa, mediante la estimulación de su liberación en momentos en que los insectos no se encuentran en intensa actividad, como por ejemplo durante el vuelo o en momentos de locomoción rápida (Gäde, 2004). Hasta el momento no han sido reportados Estudios sobre el papel de AKH en la regulación de la diuresis en ninguna especie. En la Figura **Figura 3.2.2 B)** se indica la secuencia aminoacídica del péptido sintético usado para los ensayos.

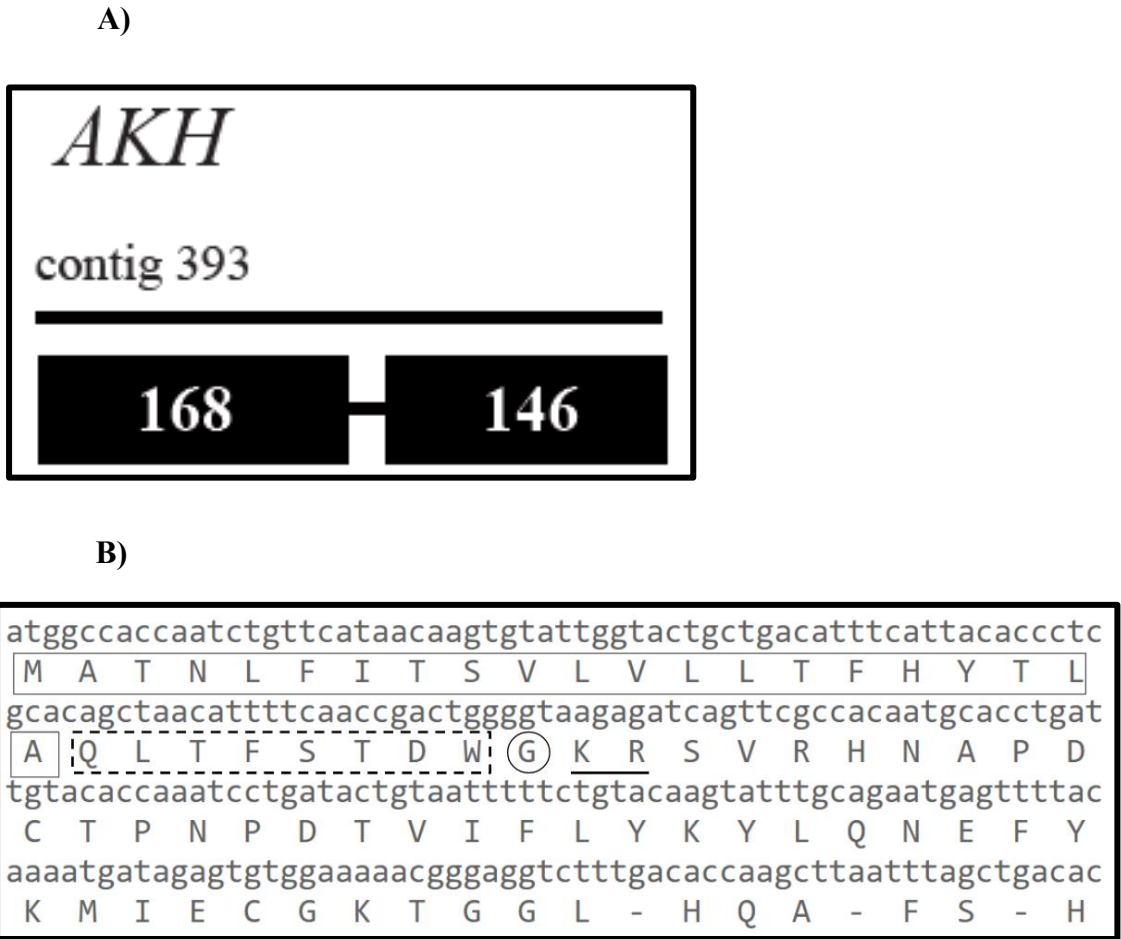


Figura 3.2.2 A) Estructura del gen precursor del neuropéptido de *RhoprAKH* (Ons *et al.*, 2011). Los números en cada exón (recuadros negros) indican su tamaño en nucleótidos El número de Contig está indicado para cada exón o grupo de exones. Las líneas representan intrones. B) Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *RhoprAKH*. El péptido señal se muestra en recuadrado. El péptido sintético

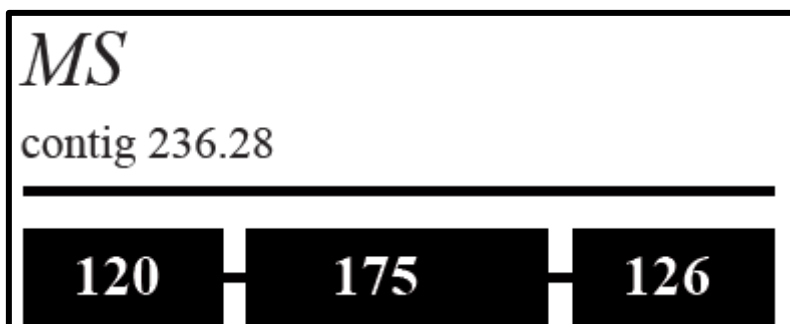
utilizado se muestra en un recuadro negro de línea cortada. Subrayado se indica uno de los sitios de clivaje. La Gly necesaria para la amidación del C - terminal se muestra con un círculo.

3) Miosupresina

El gen *RhoprMS* codifica un péptido espaciador y un péptido conservado (Ons *et al.*, 2011) (**Figura 3.2.3A**). Pertenece a la familia de neuropéptidos de insectos conocida como “FLRFamida”, que tienen en común la presencia del heptapéptido - DHVFLRFamida en su extremo C-terminal. El péptido y dos formas modificadas: piro-QDIDHVF(M-OH) y piro-QDIDHVFMRf-amida fueron encontradas por MS / MS en el cerebro de *R. prolixus* (Ons *et al.*, 2009). Este último también fue detectado en hemolinfa y en los extractos del intestino medio posterior (Ons *et al.*, 2011; Sterkel *et al.*, 2011). En cuanto al receptor, se ha identificado un GPCR (Leander *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015) que se expresa en sistema nervioso central, intestino medio, tejido reproductivo y recto (Lee *et al.*, 2015).

En la **Figura 3.2.3 B**) se indica la secuencia aminoacídica del péptido sintético usado para los ensayos.

A)



B)



Figura 3.2.3 A) Estructura del gen precursor del neuropéptido de *RhoprMS* (Ons *et al.*, 2011). Los números en cada exón (recuadros negros) indican su tamaño en nucleótidos. El número de Contig está indicado para cada exón o grupo de exones. Las líneas representan intrones. B) Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *RhoprMS*. El péptido señal se muestra en recuadrado. El péptido sintético utilizado se muestra en un recuadro negro de línea cortada. Subrayado se indican los sitios de clivaje. La Gly necesaria para la amidación del C - terminal se muestra con un círculo.

4) *Neuropeptide-like precursor 1* (NPLP1)

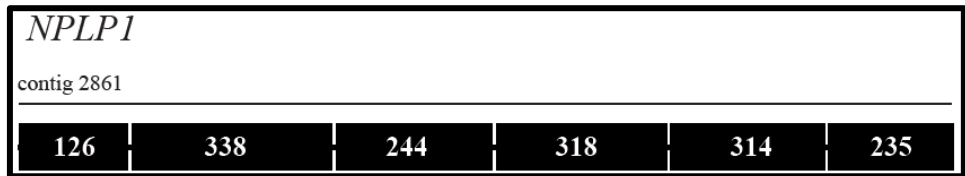
RhoprNPLP1 fue identificado por primera vez en *D. melanogaster* mediante análisis peptidómicos (Baggerman *et al.*, 2002) y posteriormente en análisis genómicos, transcriptómicos y peptidómicos de muchas especies (Ons *et al.* 2009; 2011; Sterkel *et al.*, 2011; Traverso *et al.*, 2017b). La función de los péptidos codificados por el gen precursor (**Figura 3.2.4 A**) es desconocida hasta la fecha en insectos; se ha sugerido que podrían estar asociados a la regulación de la metamorfosis en larvas de insectos holometábolos. Esta hipótesis se basó en datos obtenidos a partir de microarreglos, que muestran que la expresión del ARNm aumenta durante la pupación en *D. melanogaster* (Baggerman *et al.*, 2002). Sin embargo, ni la inyección de tres péptidos sintéticos codificados por este precursor, ni anticuerpos desarrollados contra los mismos, afectaron la velocidad de retracción o contracción en los ensayos de pupación en *Neobellieria bullata* (Verleyen *et al.*, 2009). Estudios de peptidómica cuantitativa en *R. prolixus* realizados en nuestro grupo sugieren un papel de *RhoprNPLP1* en la respuesta inmediata a la ingesta de sangre (Sterkel *et al.*, 2011).

Al menos uno de los péptidos codificados en el gen precursor *DromeNPLP1* actúa a través de un receptor de guanilato ciclasa (Overend *et al.*, 2012). Se ha descrito un

ortólogo de este receptor en *R. prolixus* (RPRC013388) con un alto nivel de identidad entre las secuencias (57,7%) (Ons *et al.*, 2016).

En la **Figura 3.2.4 B)** se muestra la secuencia aminoacídica del péptido sintético utilizado en este trabajo.

A)



B)

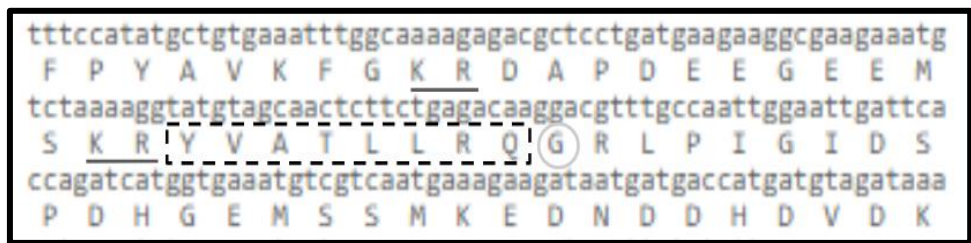


Figura 3.2.4 A): Estructura del gen precursor del neuropéptido de *RhoprNPLP1* (Ons *et al.*, 2011). Los números en cada exón (recuadros negros) indican su tamaño en nucleótidos. El número de Contig está indicado para cada exón o grupo de exones. Las líneas representan intrones. B) Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *RhoprNPLP1*. El péptido sintético utilizado se muestra en un recuadro negro de línea cortada. Subrayado se indican los sitios de clivaje. La Gly necesaria para la amidación del C - terminal se muestra con un círculo.

5) Orcokinininas

Las Orcokinininas (OK) son una familia de neuropéptidos que ha sido caracterizada inicialmente en el crustáceo *Orconectes limosus* (Stangier *et al.*, 1992) y posteriormente en insectos (Pascual *et al.*, 2004) (ver información detallada en el Capítulo 4 de la presente Tesis Doctoral). Aún permanece desconocido el o los receptores de OKs (Ons *et al.*, 2016); nuestro grupo de trabajo está especialmente abocado en el estudio de la fisiología de este sistema neuropeptídico.

En las **Figuras 3.2.5 A), B) y C)** se muestran las estructuras de los genes precursores y los péptidos sintéticos usados para los ensayos.

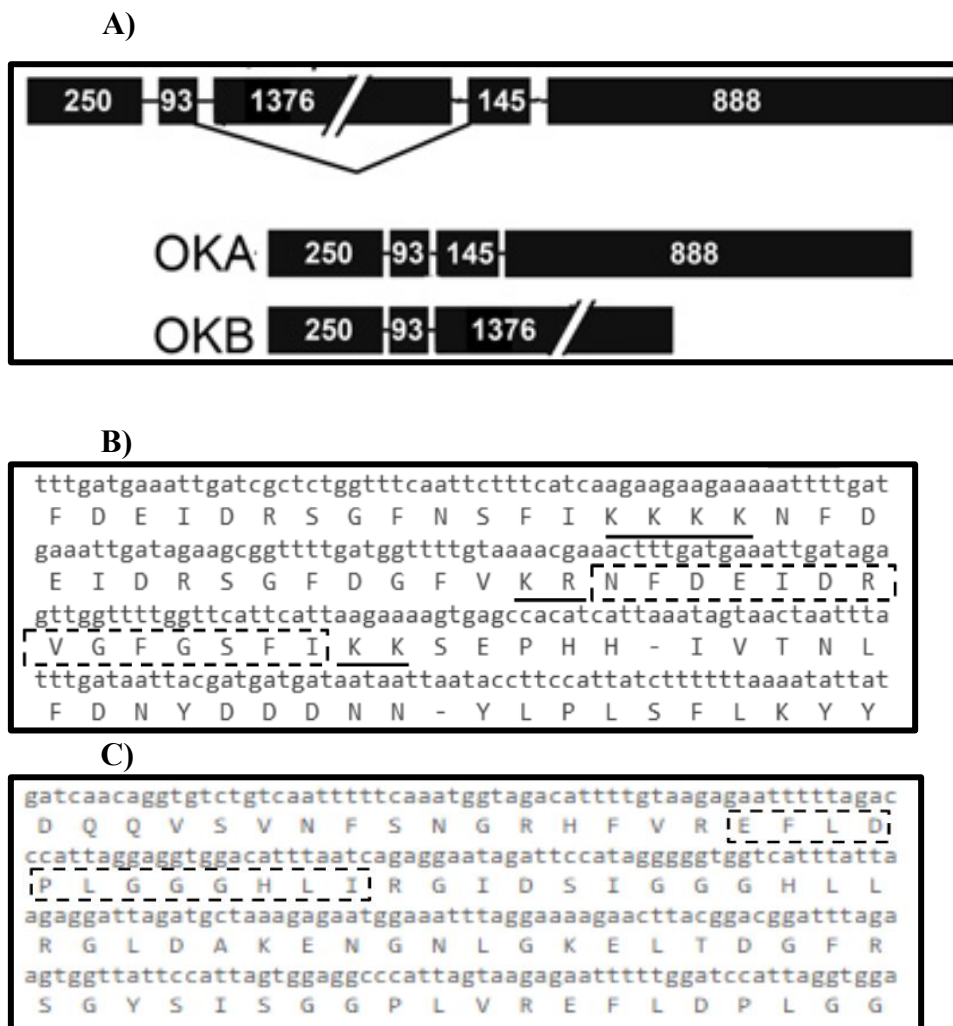


Figura 3.2.5 A): Estructura del gen precursor del neuropéptido *RhoprOKs* (Sterkel et al, 2012). Los números en cada exón (recuadros negros) indican su tamaño en nucleótidos. Las líneas representan intrones. Los transcritos de OKA y OKB se producen por *splicing alternativo* a partir del mismo gen precursor. B y C) Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *RhoprOKA* y *RhoprOKB*, respectivamente. El péptido sintético utilizado se muestra en un recuadro negro de línea cortada.

6) Péptido Transportador de Iones

El gen precursor *RhoprITP* codifica para dos variantes de *splicing*: *RhoprITPA* y *RhoprITPB* (Ons et al., 2011) (**Figura 3.2.6 A**). Un péptido corto con la secuencia GPSSRLVLSHPLN está codificada en las isoformas A y B, mientras que *RhoprITPA* también codifica un péptido amidado, y *RhoprITPB* codifica otros dos péptidos no amidados. El Péptido Transportador de Iones (ITP) fue aislado por primera vez a partir de la corpora cardiaca (Audsley et al, 1992). Se propuso un papel antidiurético basado en su participación en el transporte de iones observado en el intestino medio de *Schistocerca gregaria* (Audsley et al., 1992). Otras funciones que se le han atribuido son: ecdisis en

M. sexta (Drexler *et al.*, 2007), la modulación del ritmo circadiano en *D. melanogaster* (Johard *et al.*, 2009) y maduración ovárica en *T. castaneum* (Begum *et al.*, 2009). En *R. prolixus* se desconoce su función hasta el momento. Recientemente, se han descrito tres GPCR para ITP en *Bombyx mori*: BNGR-A2, BNGR-A24 y BNGRA34 (Nagai *et al.*, 2014). Posibles ortólogos en el genoma de *R. prolixus* han sido predichos a partir de secuencias transcriptómicas: RPRC004793 (35,7% de identidad aminoacídica con BNGR-A2) y RPRC008022 (50,7% de identidad aminoacídica con BNGR-A24) (Ons., 2016). En la **Figura 3.2.6 B)** se muestran el péptido sintético usado para los ensayos.

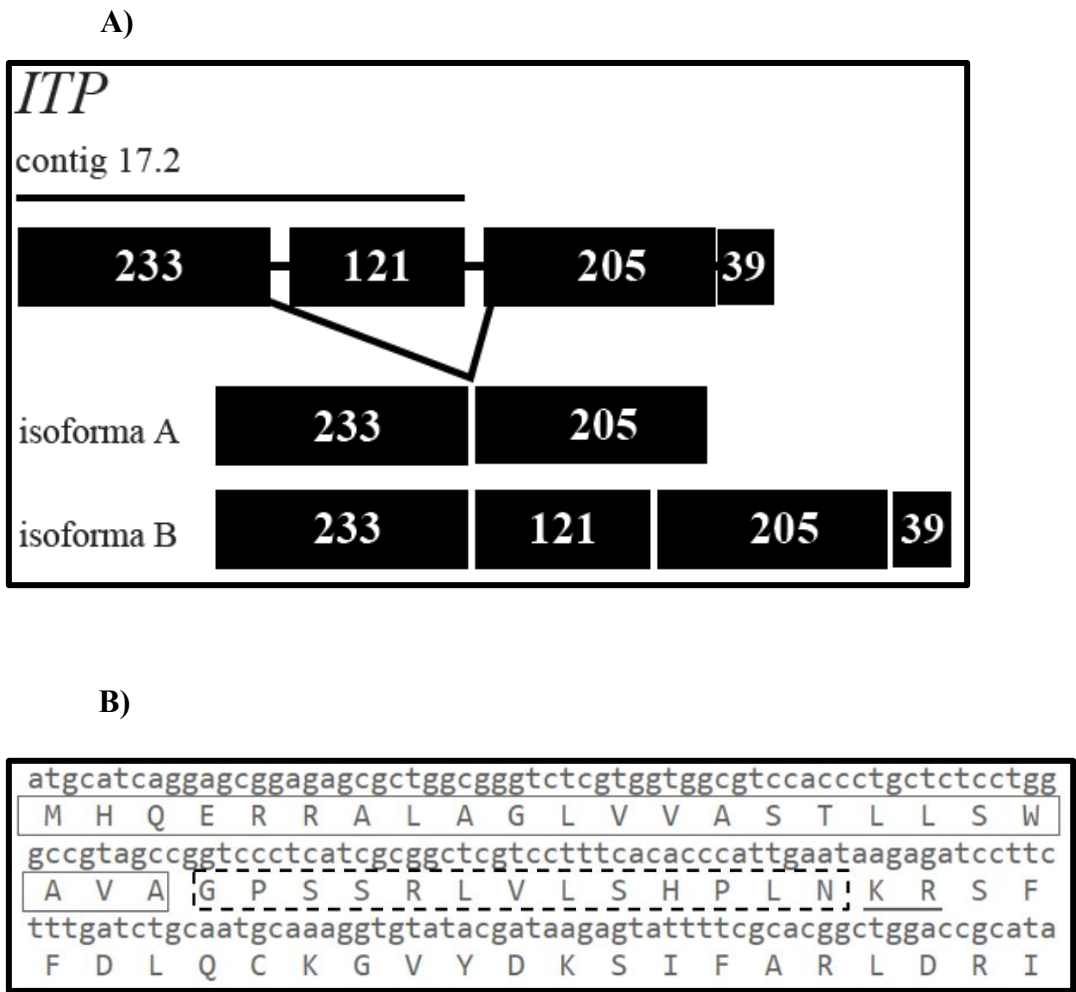
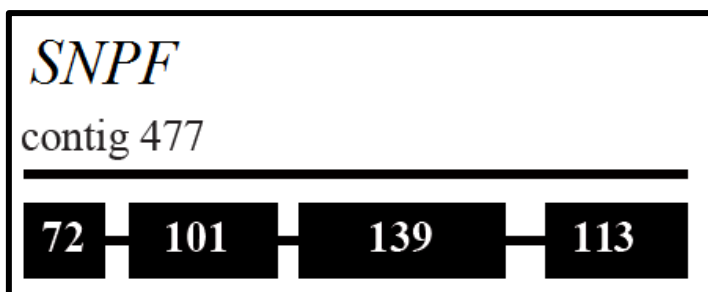


Figura 3.2.6 A): Estructura del gen precursor del neuropéptido *RhoprITP* (Ons *et al.*, 2011). Los números en cada exón (recuadros negros) indican su tamaño en nucleótidos. Las líneas representan intrones. Los transcritos de ITPA y ITPB se producen por *splicing alternativo* a partir del mismo gen precursor. B) Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *RhoprITP B*. El péptido sintético utilizado se muestra en un recuadro negro de línea cortada. Subrayado se indica uno de los sitios de clivaje.

7) Neuropeptido F corto

El gen precursor de *RhoprSNPF* es más corto que sus ortólogos en otras especies. Codifica un péptido central y dos péptidos espaciadores (**Figura 3.2.7 A**). *RhoprSNPF* fue detectado por espectrometría de masa en extractos de cerebro y hemolinfa (Ons *et al.*, 2011). Los primeros miembros de esta familia fueron aislados de *Locustra decemlineata* y designados con ese nombre debido a que presentan homología en el extremo C-terminal con el Neuropeptido Y de vertebrados (Spittaels *et al.*, 1996). En *D. melanogaster* se ha sugerido que este péptido está involucrado en la regulación de la alimentación, ya que su sobreexpresión produce un aumento en la cantidad de alimento ingerido, mientras que los mutantes donde no se expresa este péptido no se alimentan (Lee *et al.*, 2004). Posteriormente, se demostró que en *L. decemlineata* se expresa de manera diferencial en los insectos durante el estado activo, respecto a los que se encuentran en diapausa. Se ha descrito su implicancia en el desarrollo ovárico de *L. migratoria* y *S. gregaria* (Cerstaens *et al.*, 1999), y provoca un aumento en la concentración de vitelogenina en hemolinfa en *S. gregaria* (Schoofs *et al.*, 2001). En la **Figura 3.2.7 B**) se muestra el péptido sintético usado para los ensayos.

A)



B)

```

aggaagaataacagatctcctcaactgaggctccgattcggacgcagaaatgatccacc
R K [N N R S P Q L R L R F] (G) R R N D P T
ttccttcaggagggtgaccatctaattggacaactctatgattgatactctatagaagttg
F L Q E G D H L M D N S M I D T L - K L
atttaattaagaaactataaatatatatttcattttctattgctta
I - L R N Y K Y I Y F I F Y C L

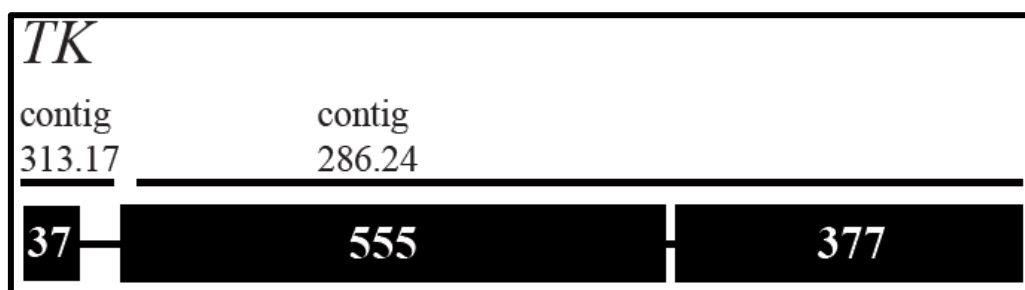
```

Figura 3.2.7 A): Estructura del gen precursor del neuropeptido *RhoprSNPF* (Ons *et al.*, 2011). Los números en cada exón (recuadros negros) indican su tamaño en nucleótidos. Las líneas representan intrones. B) Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *RhoprSNPF*. El péptido sintético utilizado se muestra en un recuadro negro de línea cortada. Subrayado se indican los sitios de clivaje. La Gly necesaria para la amidación del C - terminal se muestra con un círculo.

8) Taquikininas (TK)

Las Taquikininas (TK) pertenecen a una familia conservada de neuropéptidos, se ha determinado su expresión tanto en el SN como en sistema digestivo de vertebrados e invertebrados (Satake *et al.*, 2003). Las TK de vertebrados se caracterizan por tener la secuencia consenso –FXGLMamida (X representa cualquier aminoácido) en el extremo C-terminal, mientras que las de invertebrados contienen la secuencia –FXGXRamida. Ensayos de expresión heteróloga del receptor demostraron que el pentapéptido C-terminal es suficiente para activarlo, y determina la especificidad entre los receptores de vertebrados e invertebrados. El reemplazo de Fen por Ala provoca pérdida de actividad (Torfs *et al.*, 2002). La primer TK descripta en insectos fue aislada de extractos del SNC de *L. migratoria* a partir de sus propiedades miotrópicas sobre musculatura del recto (Schoofs *et al.*, 1990). Posteriormente, en varios grupos de insectos fueron descriptos péptidos de esta familia, así como los genes que los codifican. Un solo precursor da origen a todos los péptidos de la familia de TK en todas las especies de invertebrados estudiadas. Los péptidos de esta familia han demostrado ser pleiotrópicos, y se encuentran asociados al procesamiento de información sensorial, la actividad motora y la contracción de la musculatura visceral (Satake *et al.*, 2003). En *R. prolixus*, se encontró inmunomarcación positiva para TK tanto en el SNC como en el intestino medio, utilizando un suero policlonal generado contra TK1 de *L. migratoria*. Se demostró también que TK-1 y TK-2 de *L. migratoria* son capaces de causar un incremento en la frecuencia de contracción del recto en *R. prolixus* (Kwok *et al.*, 2005). En la **Figura 3.2.8 A y B** se muestra la estructura del gen precursor y el péptido sintético usados para los ensayos.

A)



B)

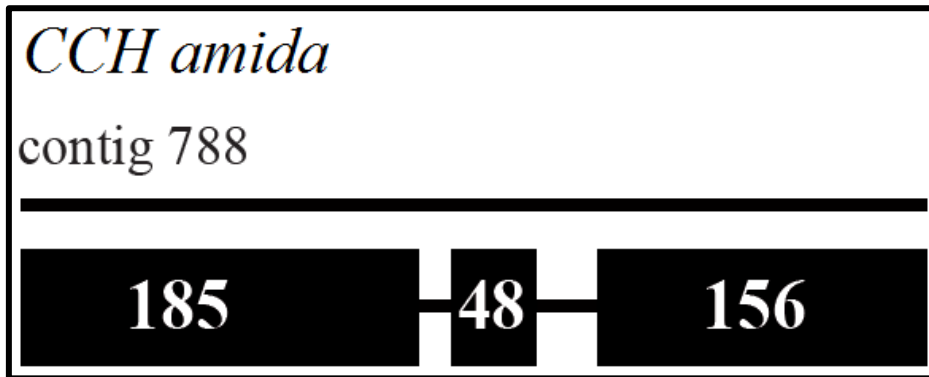


Figura 3.2.8 A): Estructura del gen precursor del neuropéptido *RhoprTK* (Ons *et al.*, 2011). Los números en cada exón (recuadros negros) indican su tamaño en nucleótidos. Las líneas representan intrones. **B)** Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *RhoprTK*. El péptido sintético utilizado se muestra en un recuadro negro de línea cortada. Subrayado se indican los sitios de clivaje. La Gly necesaria para la amidación del C - terminal se muestra con un círculo.

9) CCHamida

CCHamida ha sido descrito como un neuropéptido del intestino involucrado en el crecimiento, la alimentación y la olfacción en *D. melanogaster* (Farhan *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2015; Sano *et al.*, 2015). Como en otros insectos, se detectaron dos isoformas de CCHamida en *R. prolixus*, uno de ellos en el sistema nervioso (Ons *et al.*, 2011) y el otro en bases de datos transcriptómicas de intestino medio anterior y testículo. Dos posibles GPCR se identificaron en la secuencia genómica: RPRC007766 y RPRC000608 (Ons *et al.*, 2016). No se han reportado estudios funcionales para CCHamida en *R. prolixus* hasta la presente Tesis Doctoral (Capítulo 3). En la **Figura 3.2.9 A y B)** se muestra la estructura del gen precursor y el péptido sintético usados para los ensayos.

A)



B)

```

aatgttgctcggctctgtagatcgttctctgatcgtggcagctcgcatttcccagattttc
  C C R L C R S F S D R W Q L A F P E F F
gcatttccgagtatttttttttggtagatccaggacaccatgatctgctccaggaag
  A F P S I F F L V R S R D T M I C S R K
atgatcgtcactctgctgttggtcagcttactgctcaccgtccatggagccgctttcaaa
  M I V T L L L V S L L L T V H G A A F K
ggtgccagagatggagatgcttcatttcgcaaaaaaccgctgagaagaggtggatgttca
  G A R D G D A S F R K K P L R R G G C S
gcatttgggcattcatgttttggaggccatggcaaacgatccgacgactatatggcacag
  A F G H S C F G G H G K R S D D Y M A Q
atacagtccagacagctccagcggttacctcccgtgatattgttcgacaatgggtatct
  I Q S R Q L Q R L P P A D I V R Q W V S
gtattttgtatctctaacctgttgtaa
  V F C I S N L L -

```

Figura 3.2.9 A): Estructura del gen precursor del neuropéptido *RhoprCCHa* (Ons *et al*, 2011). Los números en cada exón (recuadros negros) indican su tamaño en nucleótidos. Las líneas representan intrones. B) Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *RhoprCCHa*. El péptido sintético utilizado se muestra en un recuadro negro de línea cortada. Subrayado se indican los sitios de clivaje. La Gly necesaria para la amidación del C - terminal se muestra con un círculo.

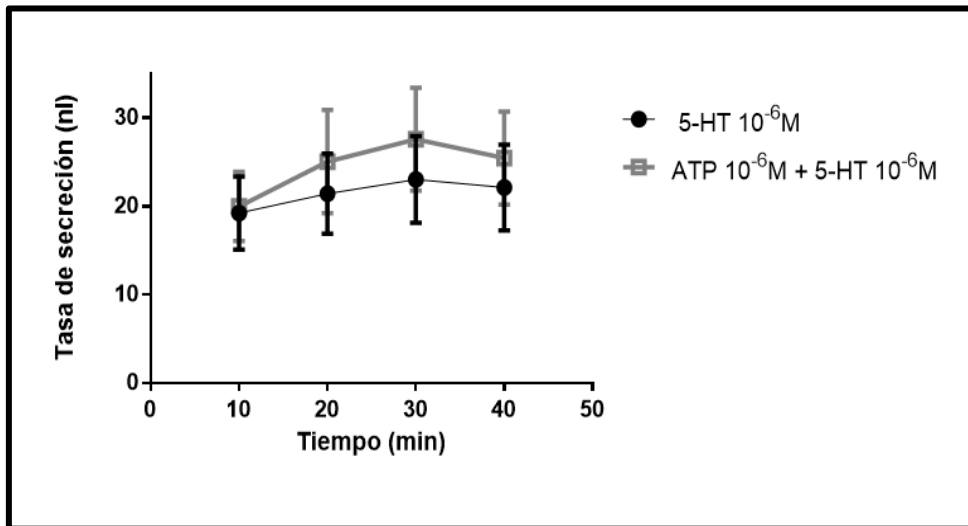
3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Efecto de Alatotropina

El estudio del péptido sintético codificado en el transcripto *RhoprAT* no mostró diferencias significativas en la secreción de los túbulos tratados con 5-HT y los tratados con *RhoprAT* y 5-HT (n= 16-14, p=0,1021) (**Figura 3.2.10 A**). Las diferencias de

volumen acumulado para cada tratamiento, a los 40 minutos post estimulación tampoco resultaron significativas ($p=0,2761$) (**Figura 3.2.10 B**).

A)



B)

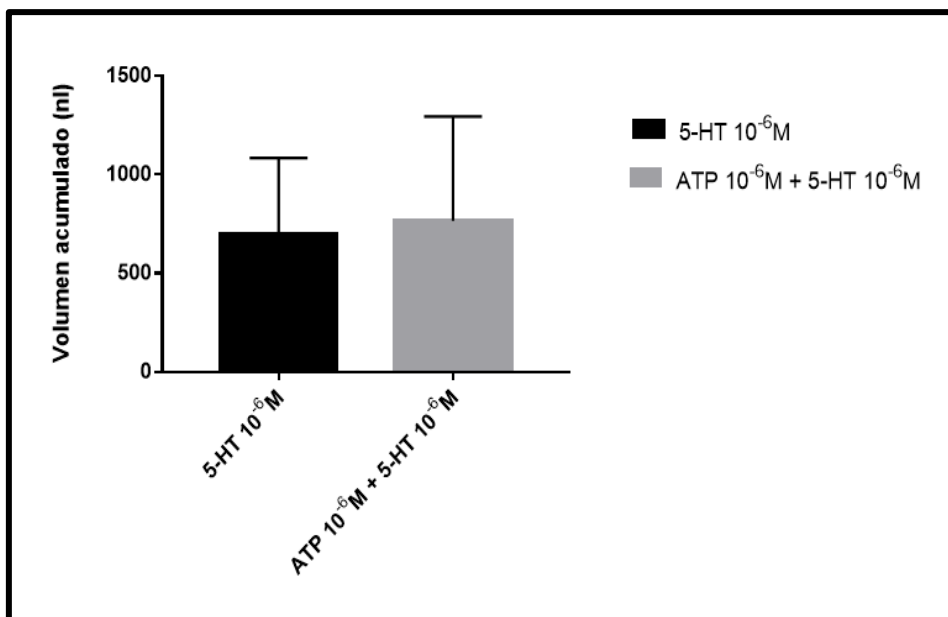
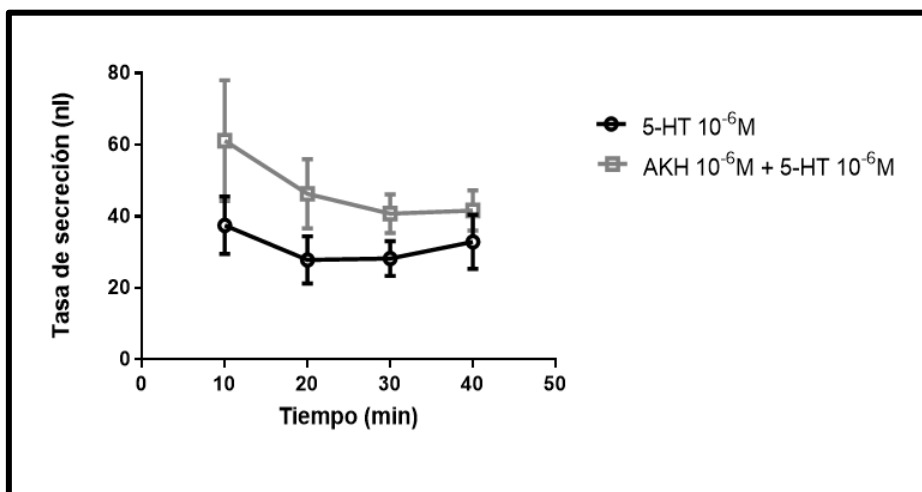


Figura 3.2.10: A) Ensayo de Ramsay para *Rhopr*ATP y volumen de excreción (nl) a distintos tiempos post - estimulación. Test estadístico t-Student, $p=0,1021$. B) Análisis de los datos de volumen acumulado excretado (nl) para *Rhopr*ATP. Test estadístico t-Student, $p=0,2761$

3.2.2.2 Hormona Adipokinetica

El estudio del péptido sintético codificado en el transcripto *RhoprAKH* no mostró diferencias significativas en la secreción de los túbulos tratados con 5-HT y los tratados con *RhoprAKH* y 5-HT ($n= 10,11$; $p=0,1735$) en ninguno de los tiempos analizados (Figura 3.2.11 A); como así tampoco para el volumen acumulado durante el ensayo ($p=0,263$) (Figura 3.2.11 B).

A)



B)

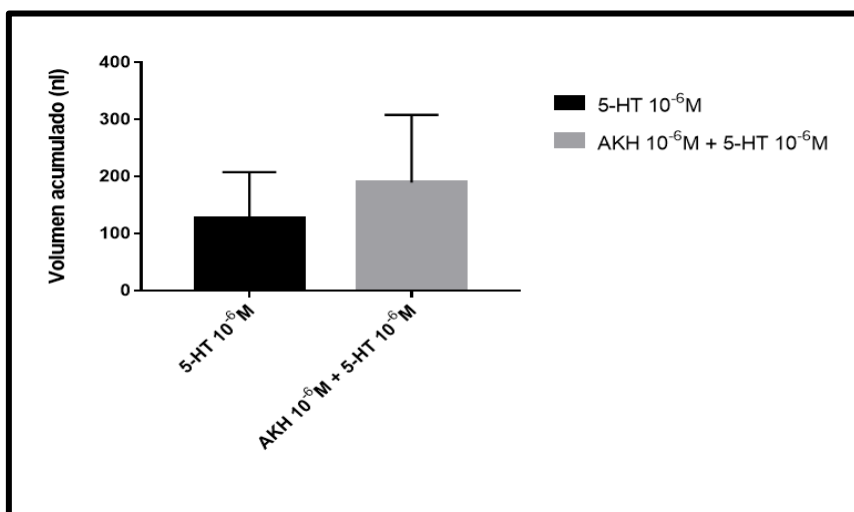
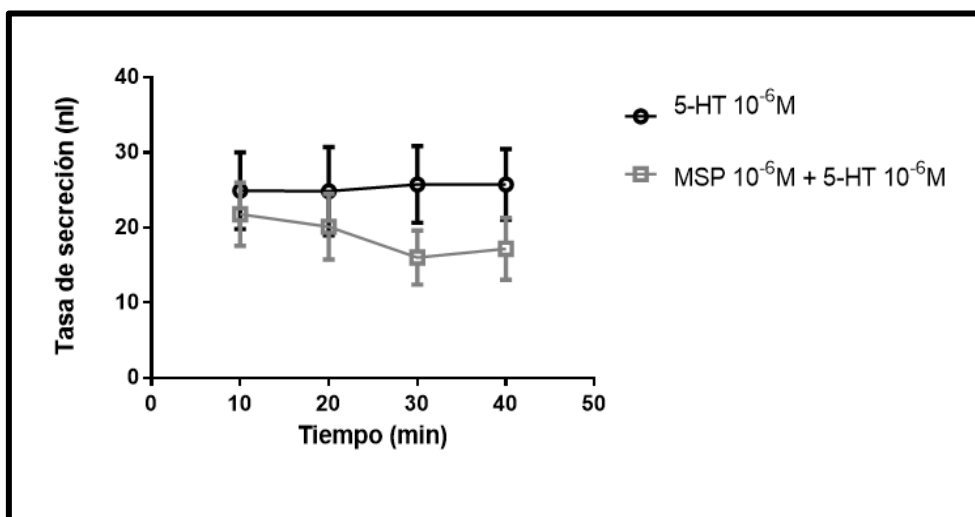


Figura 3.2.11: A) Ensayo de Ramsay para *RhoprAKH* y volumen de excreción (nl) a distintos tiempos post - estimulación. Test estadístico t-Student, $p=0,1735$. B) Análisis de los datos de volumen acumulado excretado (nl) para *RhoprATP*. Test estadístico t-Student, $p=0,263$

3.2.2.3 Miosupresina

No se observaron diferencias significativas en la secreción de los túbulos tratados con 5-HT y los tratados con *Rhopr*MSP y 5-HT ($n= 14-16$; $p=0,236$) en cada uno de los tiempos analizados (**Figura 3.2.12 A**), como así tampoco para el volumen acumulado ($p=0,342$) (**Figura 3.2.12 B**)

A)



B)

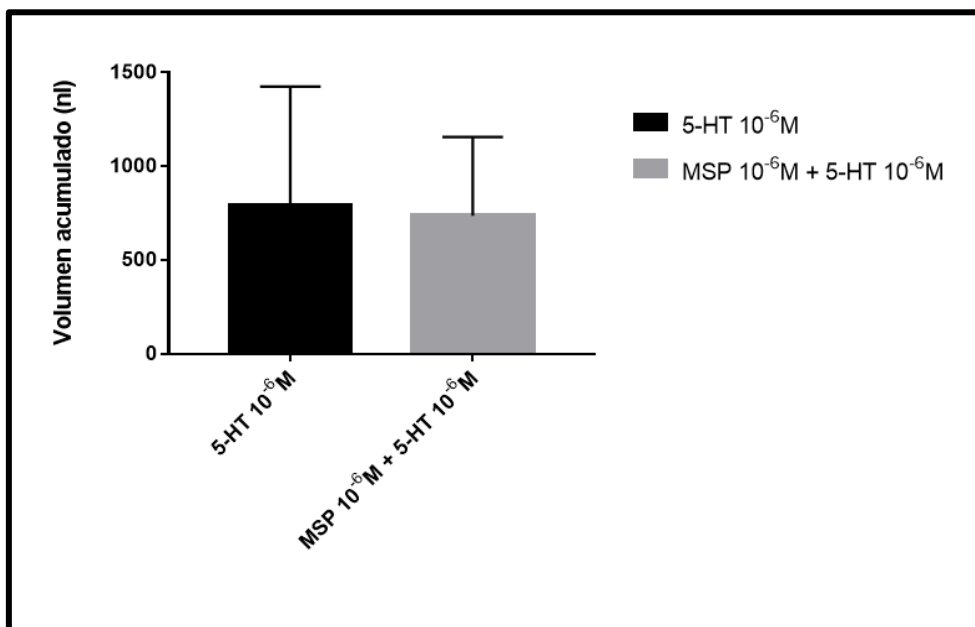
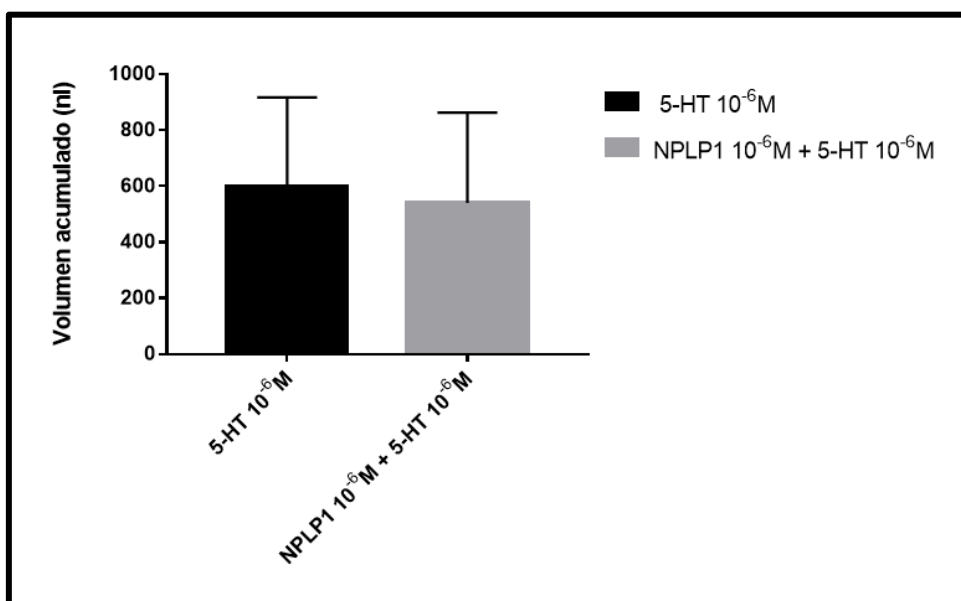


Figura 3.2.12: A) Ensayo de Ramsay para *Rhopr*MSP y volumen de excreción (nl) a distintos tiempos post - estimulación. Test estadístico t-Student, $p=0,236$. B) Análisis de los datos de volumen acumulado excretado (nl) para *Rhopr*MSP. Test estadístico t-Student, $p=0,342$

3.2.2.4 Efecto de Precursor de Neuropéptidos 1 (NPLP1)

No se observaron diferencias significativas en la secreción de los túbulos tratados con 5-HT y los tratados con *Rhopr*NPLP1 y 5-HT ($n=13, 19$ $p=0,494$), en cada uno de los tiempos post estimulación analizados (**Figura 3.2.13 A**), ni en el volumen acumulado durante todo el ensayo ($p=0,98$) (**Figura 3.2.13 B**).

A)



B)

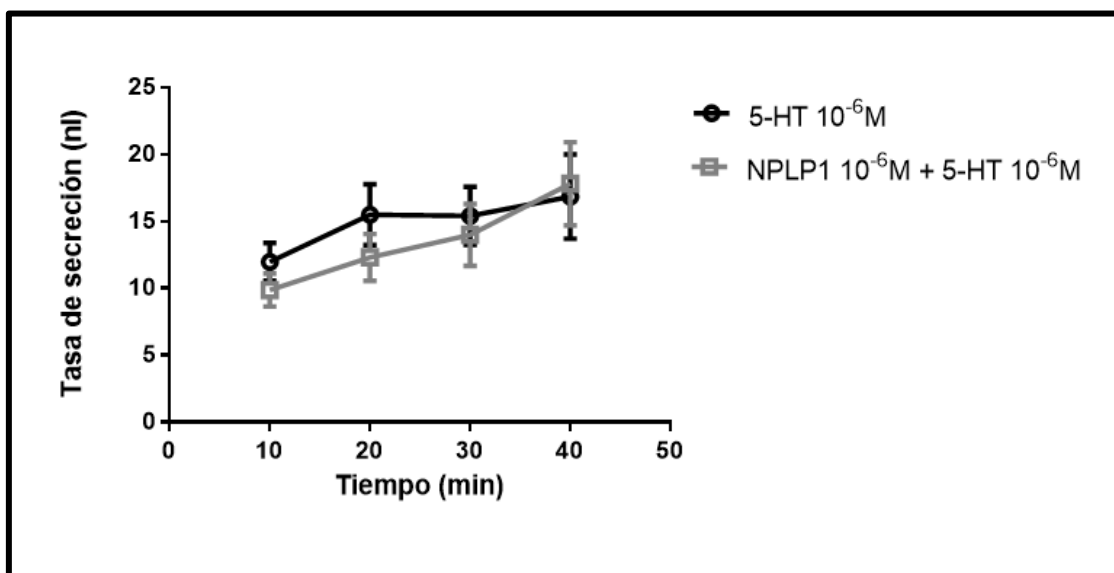
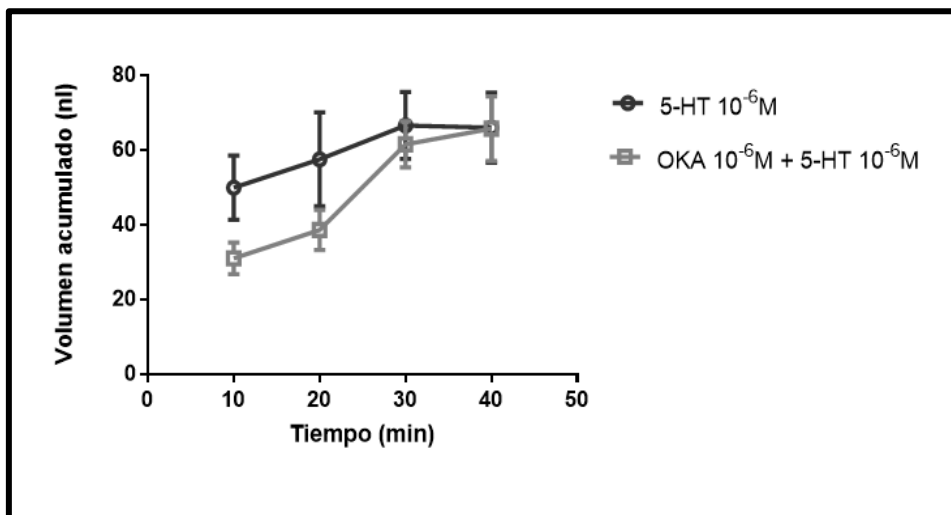


Figura 3.2.13: A) Ensayo de Ramsay para *Rhopr*NPLP1 y volumen de excreción (nl) a distintos tiempos post - estimulación. Test estadístico t-Student, $p=0,4940$. B) Análisis de los datos de volumen acumulado excretado (nl) para *Rhopr*NPLP1. Test estadístico t-Student, $p=0,98$

3.2.2.5 Orcokinina A

No se observaron diferencias significativas en los túbulos tratados con 5-HT y en aquellos tratados con OKA y 5-HT ($n=17,17$, $p=0,272$)

A)



B)

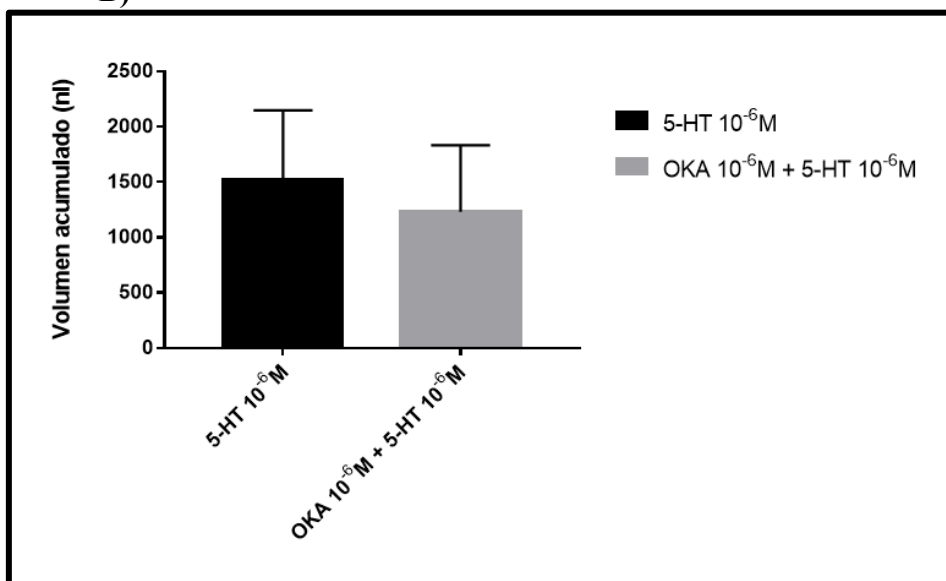
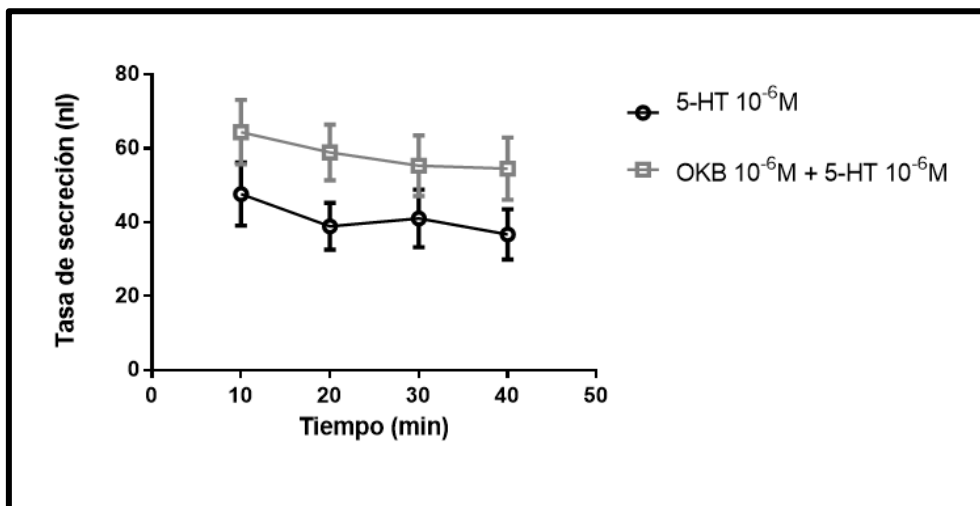


Figura 3.2.14: A) Ensayo de Ramsay para *RhoprOKA* y volumen de excreción (nl) a distintos tiempos post - estimulación. Test estadístico t-Student. B) Análisis de los datos de volumen acumulado excretado (nl) para *RhoprOKA*. Test estadístico t-Student, $p=0,272$

3.2.2.6 Orcokinina B

No se observaron diferencias significativas en los túbulos tratados con 5-HT y en aquellos tratados con OKB y 5-HT ($n= 18, 17$ $p=0,245$).

A)



B)

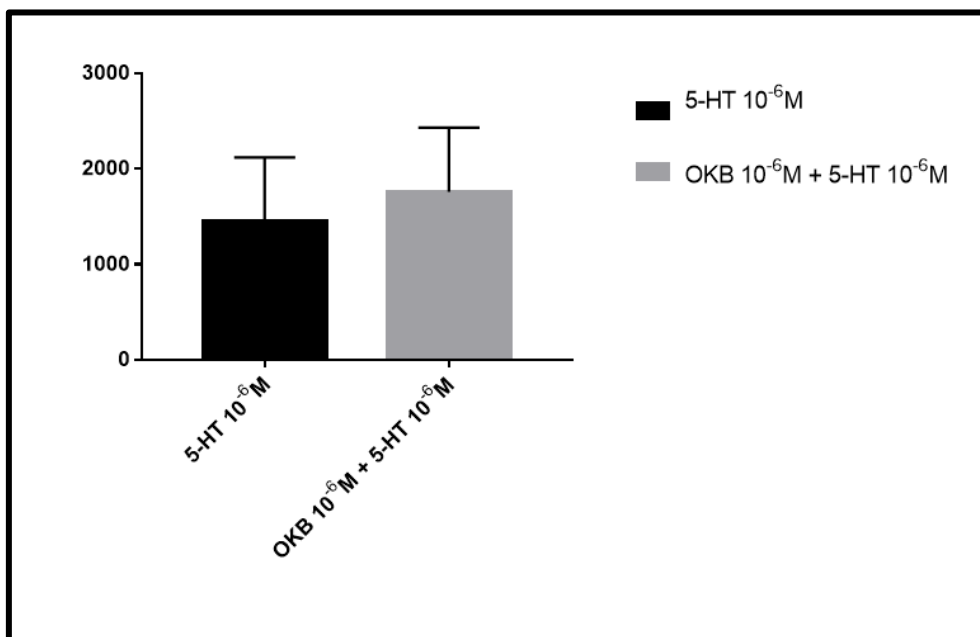
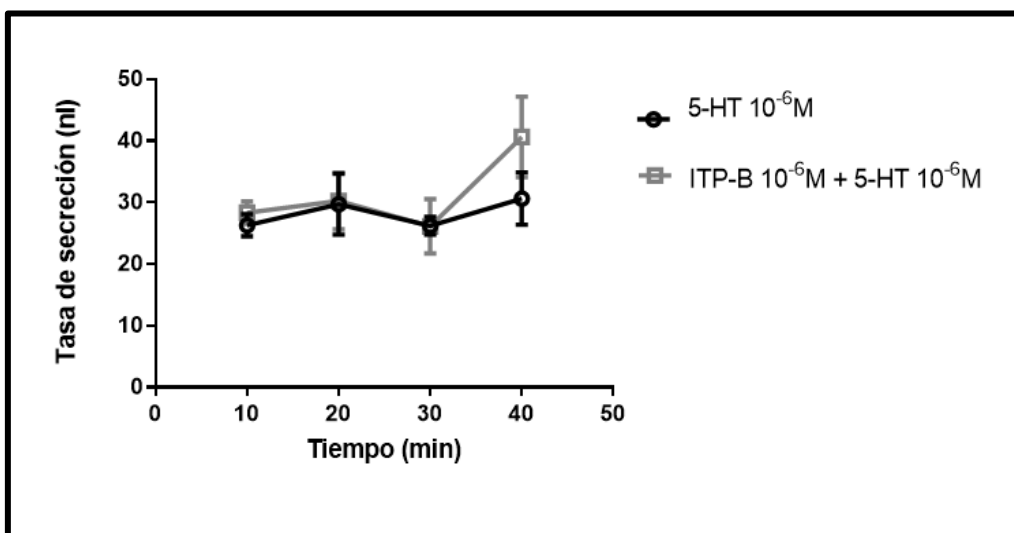


Figura 3.2.15: A) Ensayo de Ramsay para *RhoprOKB* y volumen de excreción (nl) a distintos tiempos post - estimulación. Test estadístico t-Student. B) Análisis de los datos de volumen acumulado excretado (nl) para *RhoprOKB*. Test estadístico t-Student, $p=0,245$

3.2.2.7 Péptido Transportador de Iones

No se encontraron diferencias significativas en el volumen secretado entre los túbulos de controles (5-HT) y los tratados (5-HT+ITPB) ($n= 16,20$), $p=0,1822$) (**Figura 3.2.16 A**), como así tampoco en el volumen acumulado durante el ensayo ($p=0,879$) (**Figura 3.2.16 B**).

A)



B)

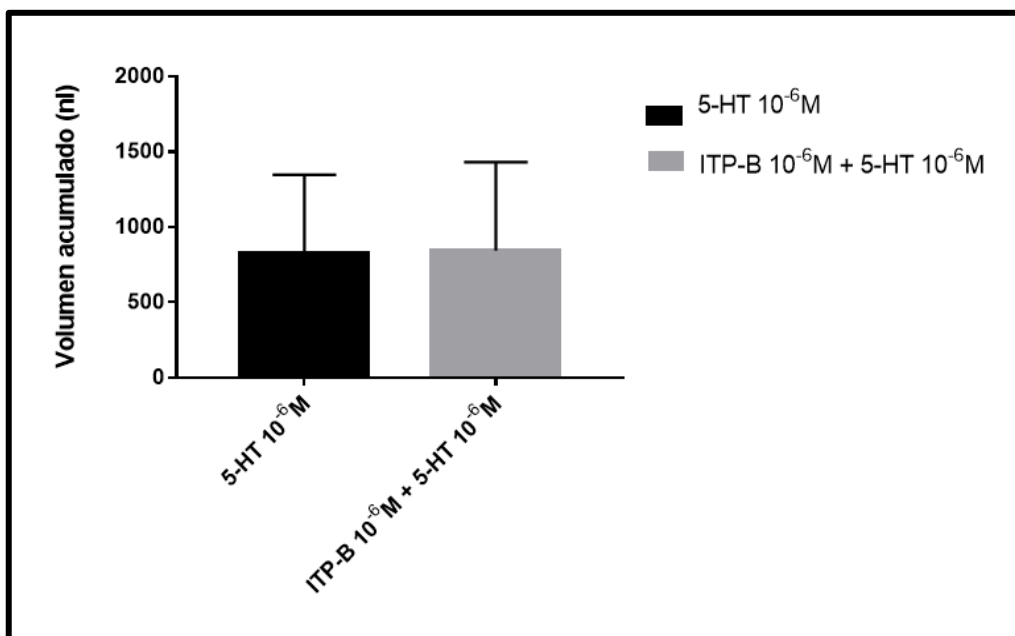
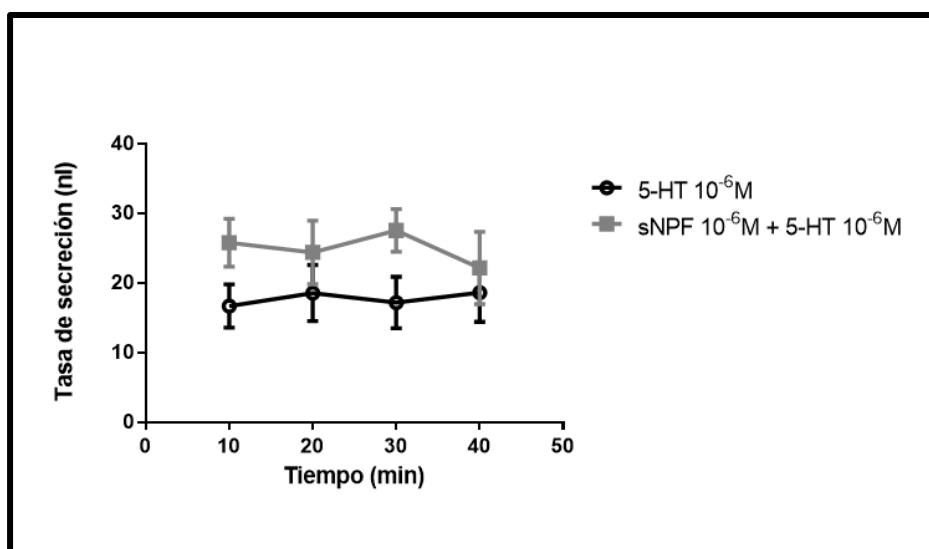


Figura 3.2.16: A) Ensayo de Ramsay para *Rhopr*ITP-B y volumen de excreción (nl) a distintos tiempos post - estimulación. Test estadístico t-Student, $p=0,1822$. B) Análisis de los datos de volumen acumulado excretado (nl) para *Rhopr*ITP-B. Test estadístico t-Student, $p=0,879$.

3.2.2.8 Short neuropeptide F

No se encontraron diferencias significativas en el volumen secretado entre los túbulos de controles (5-HT) y los tratados ($n=10,10$) (**Figura 3.2.17 A**), como así tampoco en el volumen acumulado no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0,531$) (**Figura 3.2.17 B**).

A)



B)

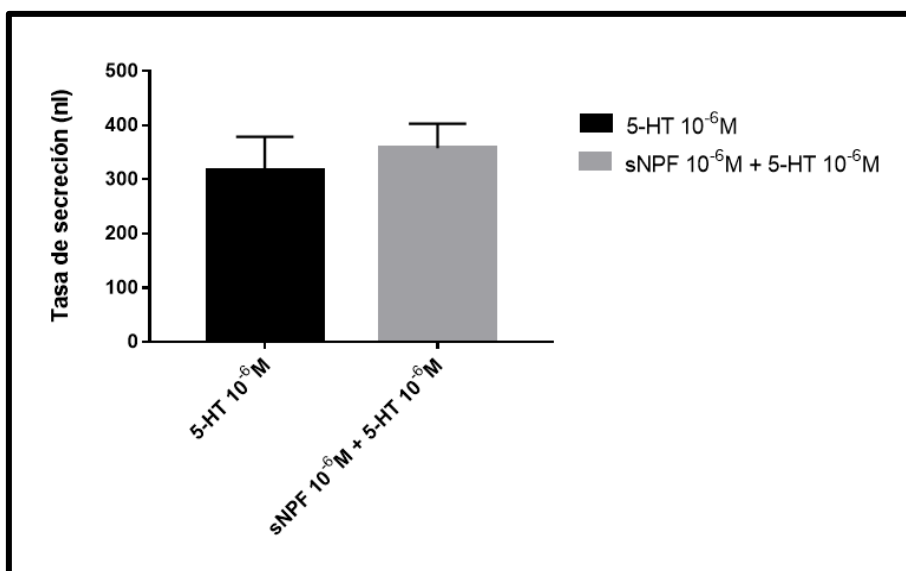
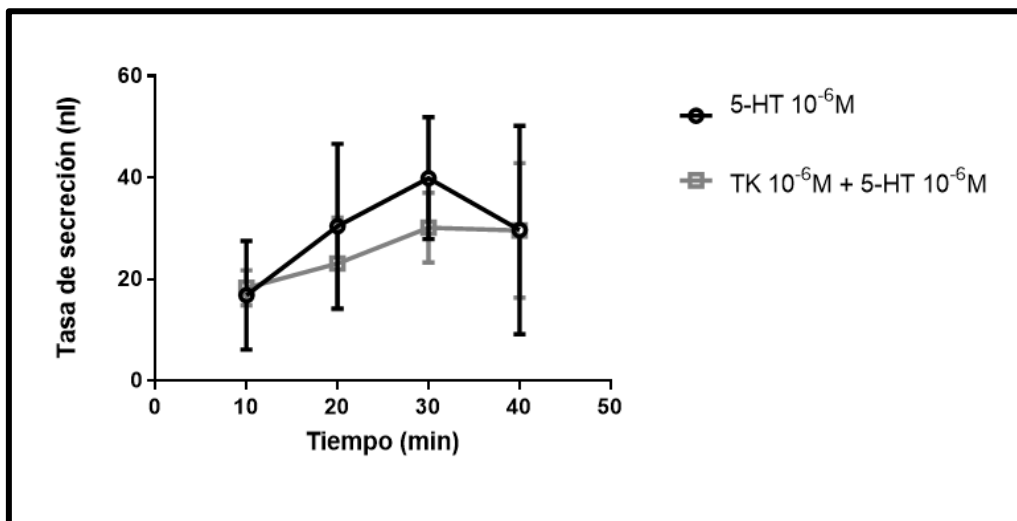


Figura 3.2.17: A) Ensayo de Ramsay para *RhoprsNPF* y volumen de excreción (nl) a distintos tiempos post - estimulación. Test estadístico t-Student. B) Análisis de los datos de volumen acumulado excretado (nl) para *RhoprsNPF*. Test estadístico t-Student, $p=0,5351$

3.2.2.9 Taquikinina

No se encontraron diferencias significativas en el volumen secretado entre los túbulos de controles y los tratados ($n= 8,11$, $p=0,4581$) (**Figura 3.2.18 A**), como así tampoco en el volumen acumulado durante el ensayo ($p=0,625$). (**Figura 3.2.18 B**)

A)



B)

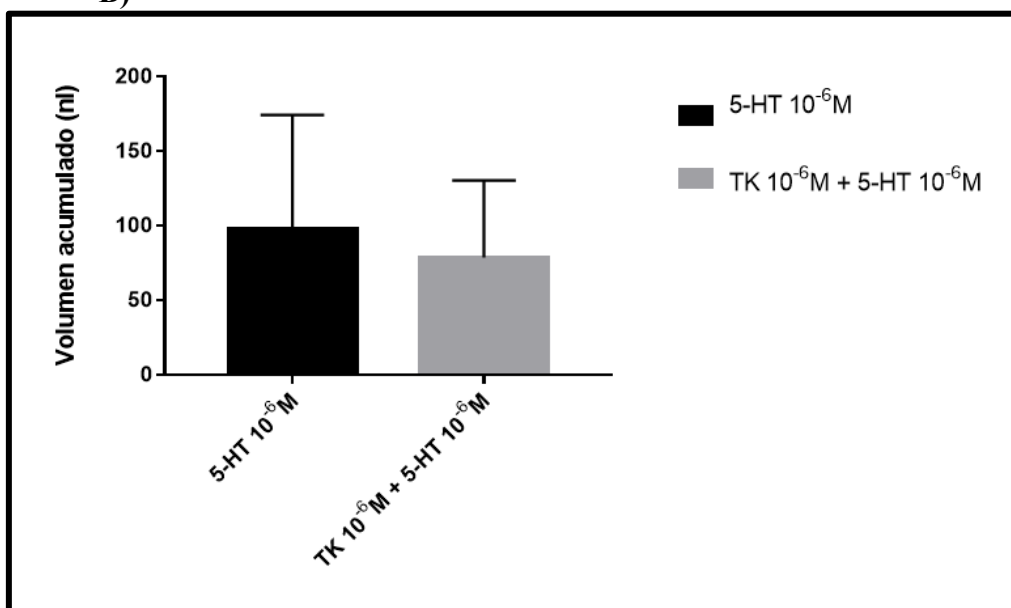
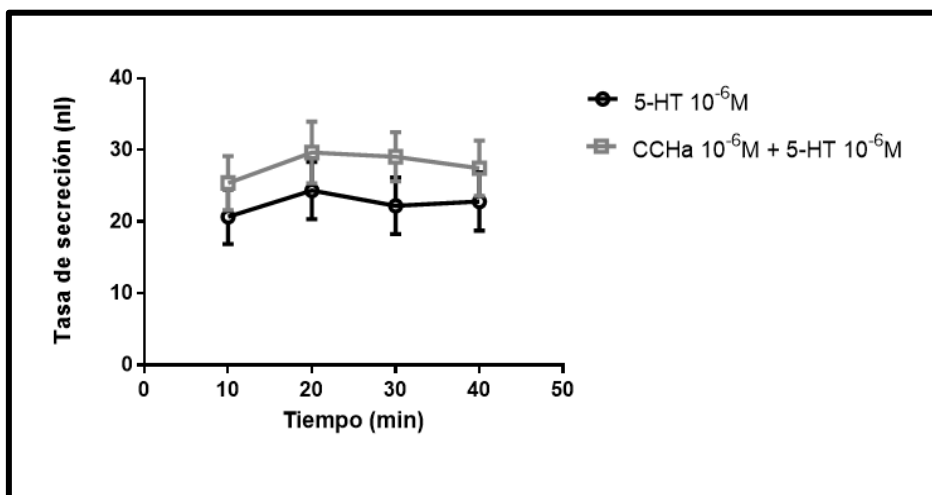


Figura 3.2.18: A) Ensayo de Ramsay para *RhoprTK* y volumen de excreción (nl) a distintos tiempos post - estimulación. Test estadístico t-Student, $p=0,4581$. B) Análisis de los datos de volumen acumulado excretado (nl) para *RhoprTK*. Test estadístico t-Student, $p=0,625$.

3.2.2.10 Efecto de CCHamida (CCHa) en la diuresis

Los grupos control (5-HT) y tratado (5-HT+CCHa) (n= 37-47, p=0,122) no presentaron diferencias significativas cuando se analizó a distintos tiempos durante el ensayo (**Figura 3.2.19 A**). Sin embargo, cuando se considera el volumen final excretado durante todo el experimento, las diferencias entre los grupos control y tratado resultaron significativas p<0,01) (**Figura 3.2.19 B**).

A)



B)

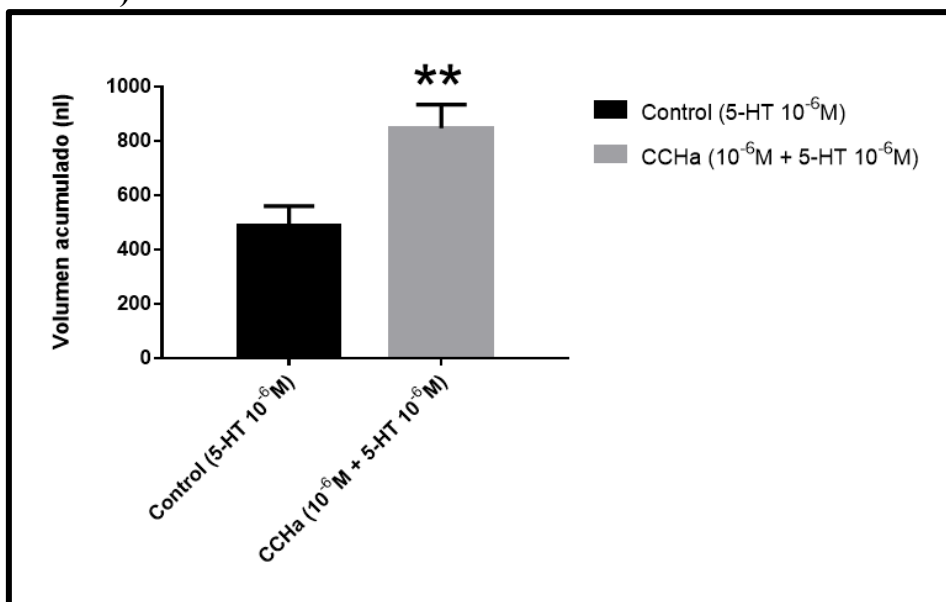


Figura 3.2.18 A): Análisis de los datos de volumen acumulado excretado (nl) para *RhoprCCH* amida, p=0,122. Test estadístico t-Student. **B)** Análisis de los datos de volumen acumulado excretado (nl) para *RhoprCCHa*. Test estadístico t-Student, p<0,01. **, indica diferencias muy significativas.

3. 2. 3 *Discusión*

Debido a su importancia en la fisiología y en la transmisión de *T. cruzi*, el estudio de la diuresis en *R. prolixus* y su regulación por 5-HT y neuropéptidos ha sido ampliamente abordado (Coast *et al.*, 2009) Sin embargo, la actividad diurética de muchos neuropéptidos no ha sido reportada.

A fin de detectar moléculas con actividad diurética previamente no identificadas, se diseñó una aproximación de “barrido” o *screening* de distintas moléculas con un único ensayo *in vitro*. Como era esperable en este tipo de aproximación, la mayoría de los péptidos testeados no presentó efecto diurético; sin embargo, hemos identificado un nuevo neuropéptido con actividad diurética sobre los túbulos de Malpighi: CCHamida. Debido a constricciones de tiempo y presupuesto, no se han ensayado las 41 familias de neuropéptidos de *R. prolixus*, sino un grupo seleccionado de acuerdo con información previa disponible. No se puede descartar que alguna/s de la/s familias no ensayadas aquí posea actividad biológica sobre los túbulos de Malpighi. Asimismo, aquí se ha estudiado un único péptido conservado por cada precursor, a una concentración alta en relación con las concentraciones fisiológicas; no podemos descartar que otro/s péptidos codificados en estos precursores posea actividad diurética en el ensayo de Ramsay, si bien consideramos que esto es poco probable puesto que, en la mayoría de los casos, los péptidos conservados codificados en un mismo precursor poseen una función biológica conservada (Nassel 2010).

A diferencia de lo reportado anteriormente con otras aproximaciones (Villalobos Sambucaro *et al.*, 2015), en nuestros ensayos no hemos detectado actividad diurética de *RhoprAT*. La función diurética de AT podría estar dada por una actividad en órganos distintos a los túbulos de Malpighi, como por ejemplo un aumento en la recirculación de hemolinfa, o en una baja en la tasa de absorción desde el intestino medio anterior.

El resultado más relevante de esta parte del trabajo ha sido la obtención de los primeros indicios sobre una posible función diurética de *RhoprCCHamida*. Esto permitió profundizar los análisis sobre el papel fisiológico de esta molécula con distintas aproximaciones experimentales, y confirmar el papel de este neuropéptido en la diuresis (ver Capítulo 3).

3.3 Capítulo 3. Estudio de la función de CCHamida en la diuresis postprandial de *Rhodnius prolixus*.

Hipotesis:

En virtud de los resultados presentados en el Capítulo 2, se plantea que CCHamida es un factor hormonal implicado en la regulación de la diuresis postprandial en *R. prolixus*.

Objetivo particular del Capítulo 3:

- Caracterizar la implicancia del neuropéptido CCHamida (CCHa) en la diuresis post prandial en *R. prolixus* a través de la técnica de silenciamiento por ARN de interferencia y ensayos de fisiología clásica.

3.3.1 Introducción

A principios del siglo XXI, la combinación de técnicas de cromatografía líquida a nano escala (nano-LC), espectrometría de masas e información genómica, dio origen a la peptidómica (Menschaert *et al.*, 2010); una parte de la proteómica que estudia los péptidos pequeños, biológicamente activos. Se ha reportado el neuropeptidoma de sistema nervioso para distintas especies de insectos, incluida *R. prolixus* (Ons *et al* 2009; 2011). La publicación del genoma completo de *R. prolixus* (Mesquita *et al.*, 2015), junto con el descubrimiento de algunos nuevos precursores de neuropéptidos de insectos, como por ejemplo Elevenin (Adamson *et al.*, 2015), CNMamida (Jung *et al.*, 2014) u Orcokinina B (Sterkel *et al.*, 2012), permitieron completar la caracterización bioinformática del neuropeptidoma de esta especie (Ons., 2017).

Hasta el momento se han identificado 41 genes precursores de neuropéptidos en *R. prolixus*, y receptores para la mayoría de ellos (Ons *et al.*, 2016; 2017). Todos estos genes son ortólogos de otros presentes en distintas especies. Para muchos de ellos se ha descrito una función clara y evolutivamente conservada (por ejemplo: Hormona Disparadora de la Ecdisis (ETH) en la regulación de la ecdisis (Zitnan y Adams., 2012), otros resultan pleiotrópicos (como por ejemplo Allostatina-C (Mayoral *et al.*, 2010) y

Alatotropinas (Lismont *et al.*, 2015)), mientras que muchos neuropéptidos de insectos permanecen poco estudiados en cualquier especie en cuanto a su papel fisiológico.

CCHamida es un neuropéptido de artrópodos, que se encuentra en insectos (Zdarek *et al.*, 2000), en crustáceos (Dirksen *et al.*, 2011; Christie e Chi, 2015), en quelicerados (Hansen *et al.*, 2011; Christie e Chi, 2015) y en quilópodos (ciempiés) (Ren *et al.*, 2015). La primera caracterización del neuropéptido CCHamida en insectos fue reportada en el lepidóptero *B. mori* (Roller *et al.*, 2008) y posteriormente, fue identificado en *D. melanogaster* (Hansen *et al.*, 2011; Veenstra e Ida, 2014). La mayoría de los insectos con un genoma secuenciado presentan dos genes CCHamida, genes parálogos que codifican los neuropéptidos CCHamida-1 y CCHamida-2; mientras que otros grupos de artrópodos solo tienen un gen (Hansen *et al.*, 2011).

En *D. melanogaster*, CCHa-1 presenta la estructura SCLEYGHSCWGAHamida y CCHa-2 presenta la estructura GCQAYGHVCYGGHamida (Ren *et al.*, 2015). Tienen una longitud de 13 residuos aminoácidos; la denominación CCHamida se fundamenta en que el sitio conservado del péptido se compone de 2 residuos Cys y una His amidada en el extremo C - terminal. A través de MS/MS se ha detectado la expresión de CCHamida-1 y CCHamida-2 en SNC e intestino en *D. melanogaster* (Reiher *et al.*, 2011). Trabajos posteriores en CCHa-2 detectaron a través de la técnica de qRT-PCR una fuerte expresión del péptido en cuerpo graso e intestino y baja expresión en SNC (Reiher *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2015).

Se han descrito dos GPCR para CCHamida en *D. melanogaster* (CG14593 y CG30106). Los dos receptores son específicamente activados por CCHamida-1 (CG30106) o CCHamida-2 (CG14593), lo cual sugiere funciones diferenciales (Hansen *et al.*, 2011). El receptor para CCHamida-1 estaría involucrado en las modificaciones olfativas inducidas por la inanición en *D. melanogaster* (Farhan *et al.*, 2013). A través del silenciamiento del receptor de CCHamida - 1 se redujo el efecto de inanición, lo que sugiere un papel de este receptor en el control de la nutrición. Por su parte, el receptor de CCHamida-2 intervendría en el control del crecimiento en *D. melanogaster*. La inyección del péptido sintético CCHamida-2 en *D. melanogaster*, estimuló la ingesta de alimento (Ida *et al.*, 2012). Probablemente la inyección del péptido imita la liberación desde las células neuroendocrinas del intestino (Ida *et al.*, 2012). Se sabe que la señalización de CCHa-2 a través de su receptor induce la producción de péptidos similares a insulina (Dilps), y que esta señalización de los tejidos periféricos al SNC mediado por la hormona CCHa-2 y su receptor estaría dada por las condiciones nutricionales. La alimentación con

aminoácidos, que incluyen leucina e isoleucina, es insuficiente para promover la expresión de CCHa-2. Sin embargo, la expresión de CCHa-2 fue inducida por la alimentación con glucosa. No se observó estimulación en la alimentación cuando se inyectó CCHamida - 1 (Ida *et al.*, 2012).

Como en otros insectos, se detectaron dos isoformas de CCHamida en *R. prolixus*, una en el sistema nervioso (Ons *et al.*, 2011) y el otra en las bases de datos de transcriptomas de intestino medio anterior y de testículo (Ons., 2017). Por búsquedas de homología y análisis filogenéticos se identificaron dos GPCR de familia A para *RhoprCCHamida* (Ons., 2017). En la **Figura 3.3.1 A)** se muestra la secuencia aminoacídica y nucleotídica del gen precursor y del péptido sintético utilizado para los ensayos de este Capítulo; y en la **Figura 3.3.1 B)** se presentan los alineamientos de secuencia de aminoácidos con otras especies de insectos. Hasta nuestro conocimiento, no se han reportado a la fecha estudios funcionales para este neuropéptido en *R. prolixus*.

A)

```

aatgttgctcggctctgtagatcgttctctgatcgctggcagctcgcatttcccgagtttttc
  C C R L C R S F S D R W Q L A F P E F F
gcatttccgagtatttttttttggtagatccagggacaccatgatctgctccaggaag
  A F P S I F F L V R S R D T M I C S R K
atgatcgctcactctgctgttggtcagcttactgctcaccgtccatggagccgctttcaaa
  M I V T L L L V S L L L T V H G A A F K
ggtgccagagatggagatgcttcatttcgcaaaaaaccgctgagaagaggtggatgttca
  G A R D G D A S F R K K P L R R G G C S
gcatttgggcattcatgttttggaggccatggcaaacgatccgacgactatatggcacag
  A F G H S C F G G H G K R S D D Y M A Q
atacagtccagacagctccagcggttacctcccgtgatattgttcgacaatgggtatct
  I Q S R Q L Q R L P P A D I V R Q W V S
gtattttgtatctctaacctgttgtaa
  V F C I S N L L -

```



Figura 3.3.1 A): Secuencia nucleotídica y aminoacídica del precursor de CCHa **B):** Alineamiento de secuencias de *RhoprCCHa* midida con los precursores caracterizados en otras especies: *Drosophila melanogaster* (Dm-CCHa2, AAL90314), *Anopheles gambiae* (Ag-CCHa2, XP_001237550), *Aedes aegypti* (Aa-CCHa2, XP_001649947), *Bombyx mori* (Bm-CCHa2, NP_001123587), *Apis mellifera* (Am-CCHa2, XP_001120020), *Tribolium castaneum* (Tc-CCHa1, de AAJJ01001703.1; Tc-CCHa2, de AAJJ01000164), *Rhodnius prolixus* (WGSACPB01045070). *Triatoma dimidiata*, *Triatoma infestans* y *Triatoma pallidipennis*, son secuencias parciales extraídas de Traverso *et al.*, 2017. En rectángulo con línea llena, se pueden apreciar 3 Cys conservadas en el precursor, y dos en el péptido activo, separadas por 6 residuos. En rectángulo con línea punteada indica supuestos posibles sitios de escisión para prohormona convertasa (PC). Las flechas indican las posiciones de escisión de la peptidasa señal (PS) o PC. El puente de cistina formado en cada CCHa se indica por debajo de las secuencias alineadas con una línea.

ARN de interferencia como método para inhibir la expresión de genes.

La técnica de ARN de interferencia (ARNi) es un proceso específico de regulación postranscripcional de la expresión génica mediado por ARN doble cadena (ARNdc). Es un fenómeno de defensa natural altamente conservado en eucariotas superiores (Carthew e Sontheimer, 2009; Berezikov, 2011). Fue descrito por primera vez en el año 1990, al descubrir una inusual supresión de genes asociados a la coloración en petunias modificadas genéticamente (Napoli *et al.*, 1990). Luego, Guo y Kemphues (1995) describieron un fenómeno similar en *Caenorhabditis elegans*, al encontrar que individuos tratados de forma independiente con hebras de ARN antisentido, inhibían la expresión del gen *par-1*. El uso de ARNdc para suprimir la expresión génica y elucidar la función de genes en insectos comenzó en 1998 cuando Kennerdell y Carthew utilizaron ARNi para estudiar la familia de genes *frizzled* en *D. melanogaster*.

Se han descrito varias clases de moléculas pequeñas de ARN que intervienen en el proceso de silenciamiento por interferencia, siendo los más conocidos los *smallRNA* (siRNA, de su sigla en inglés *small interfering RNA*) y los microRNA (miRNA, de su sigla en inglés *micro RNA*). La síntesis de los miRNAs, que regulan la expresión génica endógena, ocurre de manera natural a partir del genoma de la propia célula. Cuando pasa al citoplasma, se ensambla para formar el complejo ribonucleoproteico, que se une al ARNm diana con una complementariedad parcial. Por su parte los siRNAs son un tipo de ARN interferente con una longitud de 20 a 25 nucleótidos que es altamente específico para la secuencia de nucleótidos de su ARN mensajero blanco, interfiriendo por ello con la expresión del gen respectivo. Interviene en el mecanismo denominado interferencia de ARN, donde el siRNA interfiere con la expresión de un gen específico, reduciéndola. Además, los siRNAs también actúan en otras rutas relacionadas con el RNAi, como en la defensa antiviral o en la organización de la estructura de la cromatina en un genoma. Aunque la biogénesis de miARNs y siARNs difiere en la forma en que entran en la ruta de silenciamiento por ARNi, ambos tienen en común ciertos elementos. Ambos se generan a partir de ARNs de doble cadena. El proceso global de silenciamiento mediado por ARNi puede dividirse en tres etapas (Burand e Hunter, 2013) (**Figura 3.3.2**): (1) un ARNdc largo expresado o introducido en la célula es digerido en pequeños ARNs bicatenarios por la enzima Dicer; (2) estos pequeños ARNs se desenrollan y una cadena, conocida como la hebra guía, se ensambla al complejo denominado RISC (de su sigla en

reportado una baja sensibilidad (Belles, 2010; Terenius *et al.*, 2011). Las células del intestino medio y las embrionarias parecen ser más susceptibles al silenciamiento mediado por ARNi, mientras que otros tejidos, como las glándulas salivales, el silenciamiento es más dificultoso. En algunos casos esta dificultad puede superarse mediante el uso de una mayor cantidad de ARNdc. Por ejemplo, se ha reportado que en *An. gambiae* es suficiente la inyección de solo 140 ng de *AgApy-dc* en la hemolinfa para lograr el silenciamiento del gen en las células del intestino medio, mientras que en los hemocitos se requirió una inyección más de 10 veces superior (Boisson *et al.*, 2006).

Además de la concentración, otros parámetros que pueden afectar la eficiencia de ARNi incluyen la longitud del ARNdc (Miller *et al.*, 2012) y la secuencia del gen objetivo (Terenius *et al.*, 2011), como se demuestra en las moscas y los escarabajos. Finalmente, para su uso en control de plagas de insectos, los polimorfismos de secuencia podrían ser causa de resistencia y afectar la eficiencia, como sugirieron Katoch *et al.* (2013).

El primer estudio con ARNi en *R. prolixus* fue realizado para el silenciamiento de Nitroporinas (Araujo *et al.*, 2006). Estos autores obtuvieron resultados positivos tanto por inyección como por ingesta del ARNdc, si bien esta última con mucho menor eficiencia. Posteriormente se utilizó para estudiar genes del desarrollo (Lavore *et al.*, 2012), para la enzima alfa-galactosidasa (Mury *et al.*, 2009) y para neuropéptidos (por ejemplo, Defferrari *et al.*, 2016; Wulff *et al.*, 2017), entre otras familias génicas, con resultados satisfactorios. En nuestro laboratorio se ha utilizado ARNi para demostrar el papel de Orcokinas y otros neuropéptidos en la regulación de la ecdisis en *R. prolixus* (Wulff *et al.*, 2017 y resultados no publicados), así como la implicación de genes en la detoxificación de insecticidas (Traverso *et al.*; Sierra *et al.*, resultados no publicados).

En la **Tabla 3.3.1** se resumen algunos de los principales trabajos realizados con ARNi en Triatominos.

Organismo	Estadio	Genes <i>target</i>	Localización	Cantidad inyectada (µg)	Tamaño (pb)	% de silenciamiento	Método de Validación	Referencia
<i>R. prolixus</i>	Ninfa IV	Nitroporina 2	Glandulas salivales	2x15	548	38±7% (1 inyección) 75 ±14% (2 inyecciones)	RT-PCR Actividad anticoagulante	Araujo et al., 2006
<i>R. prolixus</i>	Ninfa II	Nitroporina 2	Glandulas salivales	13	548	42±10%	RT-PCR	Araujo et al., 2006
<i>T. brasiliensis</i>	Ninfa IV	Brasielensina	Intestino anterior	2x15	575	42±14% (1 inyección) 71 ±11% (2 inyecciones)	RT-PCR Actividad anticoagulante Ingesta de sangre	Araujo et al., 2007
<i>T. brasiliensis</i>	Ninfa III	Brasielensina	Intestino anterior	2x3	575	99%	qRT-PCR	Paim et al., 2007
<i>R. prolixus</i>	Ninfa IV	Nitroporina 1 Nitroporina 2 Nitroporina 3 Nitroporina 4	Glandulas salivales	2,6 por gen	380 548 566 547	99% para todos los genes	qRT-PCR Actividad anticoagulante Aspecto de las glándulas salivales (color) Contenido hemoproteína	Araujo et al., 2009
<i>R. prolixus</i>	Adulto ♀	Enzima α- Glucosida	Intestino medio	2 o 10	—	—	qPCR Actividad enzimática Mortalidad Oviposición	Mury et al., 2009
<i>R. prolixus</i>	Adulto	Genes gap	Embrión	2	—	—	Defectos fenotípicos en la formación de mandíbula y segmentos abdominales	Lavore et al., 2012
<i>R. prolixus</i>	Ninfa IV	CCAP CCAPR	Cerebro Glándulas salivales y recto	2	-	92 (5 días post inyección)	qRT-PCR Inmuno histoquímica	Lee et al., 2013
<i>R. prolixus</i>	Ninfa V Adultos	Quitina sintasa	Integumento Ovario	1	516	50	Efecto oviposición y morfología de los huevos qRT-PCR	Mansur et al., 2014
<i>R. prolixus</i>	Adulto	Receptor Hormona Adipokinética	Cerebro Estructuras reproductivas femeninas Aorta Cuerpo Graso	2	845 575	97 (4 días post inyección)	Ensayo de movilización de lípidos qRT-PCR	Zandawala et al., 2015
<i>R. prolixus</i>	Ninfa V	Receptor Corazonina	Cerebro Estructuras reproductivas femeninas y masculinas Aorta Cuerpo Graso	2	-	-	Ensayos de contracción <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> qRT-PCR Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	Hamoudi et al., 2016
<i>R. prolixus</i>	Ninfa V	Péptido similar a insulina	Cerebro	1	333	80 (2 días post inyección) 90 (4 y 7 días post inyección)	qRT-PCR Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	Defferrari et al., 2016
<i>R. prolixus</i>	Ninfas IV	Neuropéptido Orcokinina A y B	Cerebro Intestino medio	2	315 348 343	85 92	qRT-PCR	Wulff et al., 2017
<i>T. infestans</i>	Adultos	Vitelogenina 1 y 2	Cuerpo graso Ovario	-	-	-	qRT-PCR	Blariza et al., 2017

Tabla 3.3.1: ARNi en Triatominos.

3.3.2 Resultados

3.3.2.1. Perfil de expresión de CCHamida y sus receptores.

Mediante RT-PCR se determinó el patrón de expresión de *RhoprCCHamida* en los siguientes tejidos: SNC, intestino medio anterior, intestino medio posterior, recto y túbulos de Malpighi (**Figura 3.3.4**) de ninfas 5° estadio de *R. prolixus*. Como control positivo se utilizó ADNc de cuerpo total. En todos los tejidos analizados se confirmó la expresión del gen Actina, a fin de controlar la calidad de cada ADNc y cada reacción de PCR (**Figura 3.3.4**). Los tejidos en los cuales se detectó expresión de CCHamida fueron SNC, intestino medio anterior y túbulos de Malpighi (**Figura 3.3.4**).

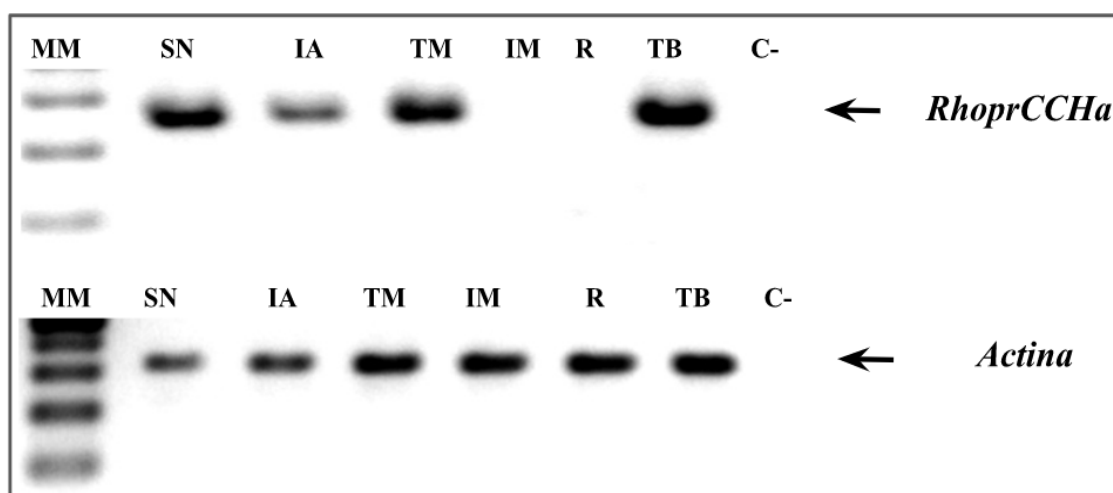


Figura 3.3.4: Perfil de expresión de CCHamida en tejidos de *R. prolixus*. Gel de agarosa tinción Br Et 2%. Amplicón de 270pb. MM: marcador de peso molecular, SN: sistema nervioso, IA: intestino anterior, TM: túbulos de Malpighi, IM: intestino medio, R: recto, TB: tejido blando, C-: control negativo.

Posteriormente estudiamos el patrón de expresión de los GPCRs que se han identificado como candidatos para CCHamida (Ons *et al.*, 2016): RPRC00776 y RPRC000608. Los resultados revelaron que RPRC00776 se expresó en cDNA proveniente intestino medio, mientras que RPRC000608 se encontró expresado en intestino anterior, túbulos de Malpighi e intestino medio. Ninguno de los dos GPCRs se encontró expresado en SNC (**Figura 3.3.5**).

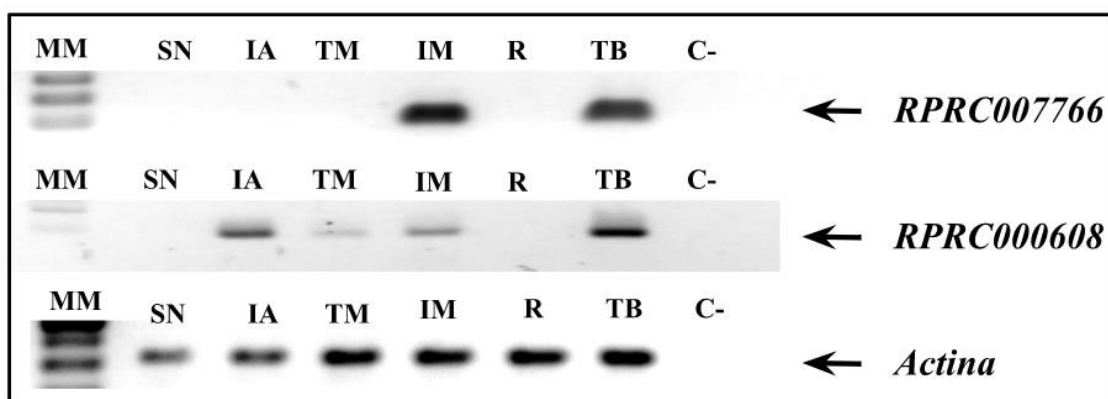


Figura 3.3.5: Expresión de los posibles receptores de CCHamida. Se muestran los resultados de RT-PCR para ambos receptores (RPRC007766 Y RPRC000608) y control *RhoprActina* por RT – PCR en distintos tejidos de *R. prolixus*. Gel de agarosa tinción Br Et 2%. Amplicón de 300 pb (*RhoprActina*) y 90pb (RPRC007766 y RPRC000608). MM: Marcador de peso molecular, SN: Sistema Nervioso, IA: Intestino Anterior, TM: Túbulos de Malpighi, IM: Intestino Medio, R: Recto, TB: Tejido Blando, C-: control negativo.

3.3.2.2 Evaluación del papel de CCHamida en la diuresis post prandial.

Los resultados presentados en el Capítulo 2 de la presente Tesis brindaron indicios acerca del posible papel de CCHamida en la regulación de la diuresis. El estudio del patrón de expresión tanto del neuropéptido como del receptor (ver más arriba) aportó evidencia en favor de esa hipótesis. Como consecuencia, decidimos abordar el silenciamiento del gen CCHamida por ARNi.

Los insectos en estadio de ninfa IV (2 semanas post muda, en ayuno desde ninfa III) fueron inyectados con 2µl de solución salina (grupo control; n=18) o bien 2 µg/2µl de ARNdc específico para el gen CCHamida (grupo dsCCHa, n=20). Siete días después de las inyecciones, los insectos fueron alimentados en forma conjunta (los dos grupos a la vez, diferenciados con una marca de pintura acrílica no tóxica) durante 20 minutos sobre la misma gallina, a fin de evitar diferencias debidas a las condiciones de alimentación. Aquellos insectos que no se alimentaron *ad libitum* fueron descartados del experimento. A fin de corroborar que la ingesta de sangre haya sido homogénea en ambos grupos los insectos, los mismos fueron pesados antes y después de la alimentación; se realizó la estimación de volumen de sangre ingerida realizando la resta “peso final – peso

inicial”. Ambos grupos ingirieron cantidades similares de sangre ($n=9, 11$; $p= 0,5596$) (**Figura 3.3.6**).

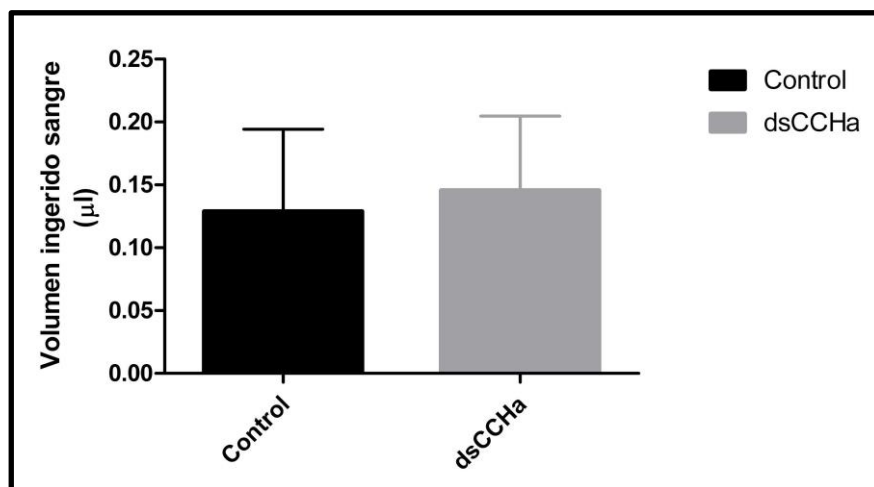


Figura 3.3.6: Estimación de volumen de sangre ingerido para el grupo control y el grupo interferido dsCCHa. Análisis estadístico prueba *t*-Student, $p=0,5596$.

Posteriormente, se hizo la estimación del volumen excretado a cada tiempo para cada insecto en particular. Los insectos fueron colocados individualmente en un tubo *ependorf* previamente rotulado con un número y tarado (registrándose así, su peso inicial) y mantenido en el mismo durante el tiempo que se estuviese evaluando. Luego de transcurrido ese tiempo, cada insecto fue pasado a un nuevo tubo rotulado con otro número y tarado. El tubo correspondiente al tiempo anterior fue pesado nuevamente. El volumen excretado a cada tiempo fue estimado como “peso final del tubo – peso inicial”. Así, se evaluaron para cada insecto un total de 8 tiempos post-ingesta de sangre (15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 y 240 min.).

Los resultados mostraron que los insectos tratados con dsCCHa presentaban un aumento significativo de la orina excretada respecto de los controles durante los primeros minutos de la diuresis post prandial (15, 30 y 45 minutos post-ingesta de sangre $p<0,05$; ANOVA 2 factores de medidas repetidas, considerando tratamientos y tiempos post ingesta $n=18-20$). A los 60 minutos de la ingesta de sangre no hay diferencia en el volumen excretado por ambos grupos (**Figura 3.3.7**). En los tiempos finales de la ingesta (90, 120, 180 y 240 min) el volumen excretado por los insectos tratados con dsCCHa es menor que el excretado por los controles (**Figura 3.3.7**) $p<0,05$; ANOVA 2 factores de medidas repetidas, considerando tratamientos y tiempos post ingesta $n=18-20$).

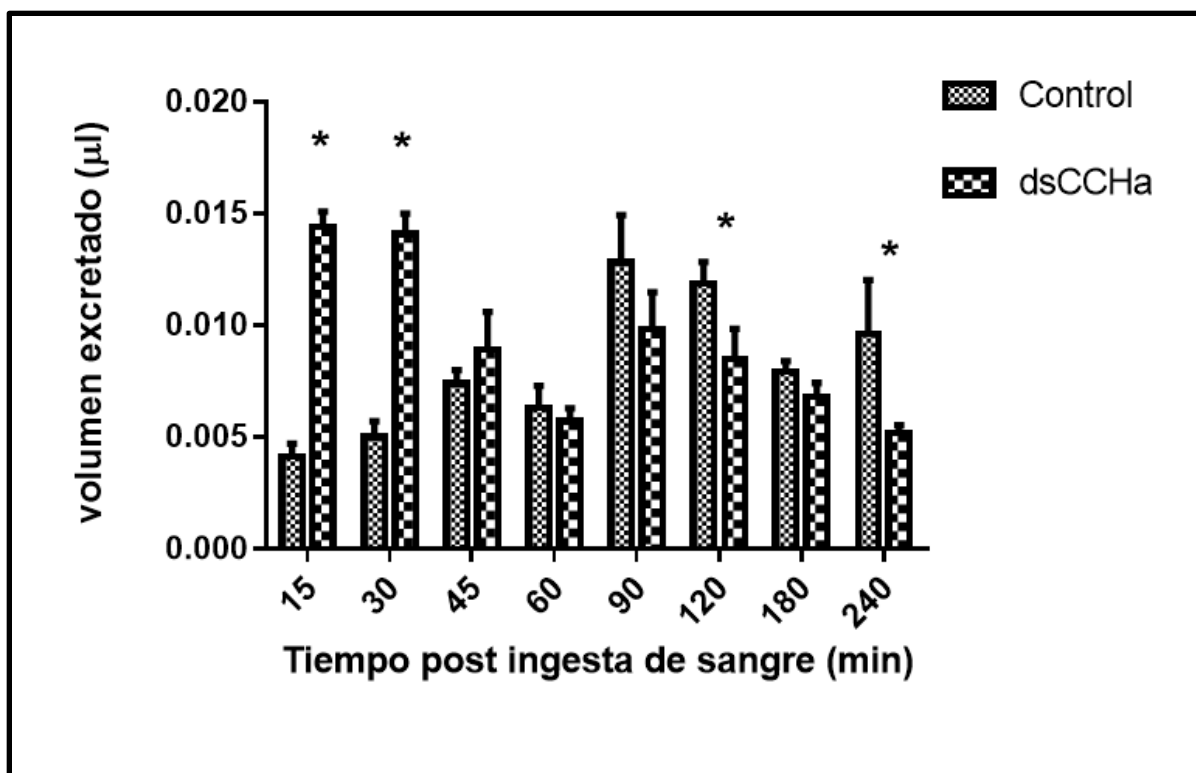


Figura 3.3.7: Silenciamiento del gen *RhoprCCHa* en ninfas 4° estadio de *R. prolixus* y diuresis a distintos tiempos post ingesta de sangre. Cada dato representa la media \pm error estándar. ANOVA 2 factores de medidas repetidas *, Indica diferencias significativas. $p < 0,05$

Si se considera el volumen total excretado relativizado al volumen ingerido durante todo el ensayo, se ve que el efecto del silenciamiento del gen *RhoprCCHa* es netamente diurético. Según estos resultados, el péptido *RhoprCCHa* cumpliría un papel inhibiendo la diuresis post-prandial (**Figura 3.3.8**).

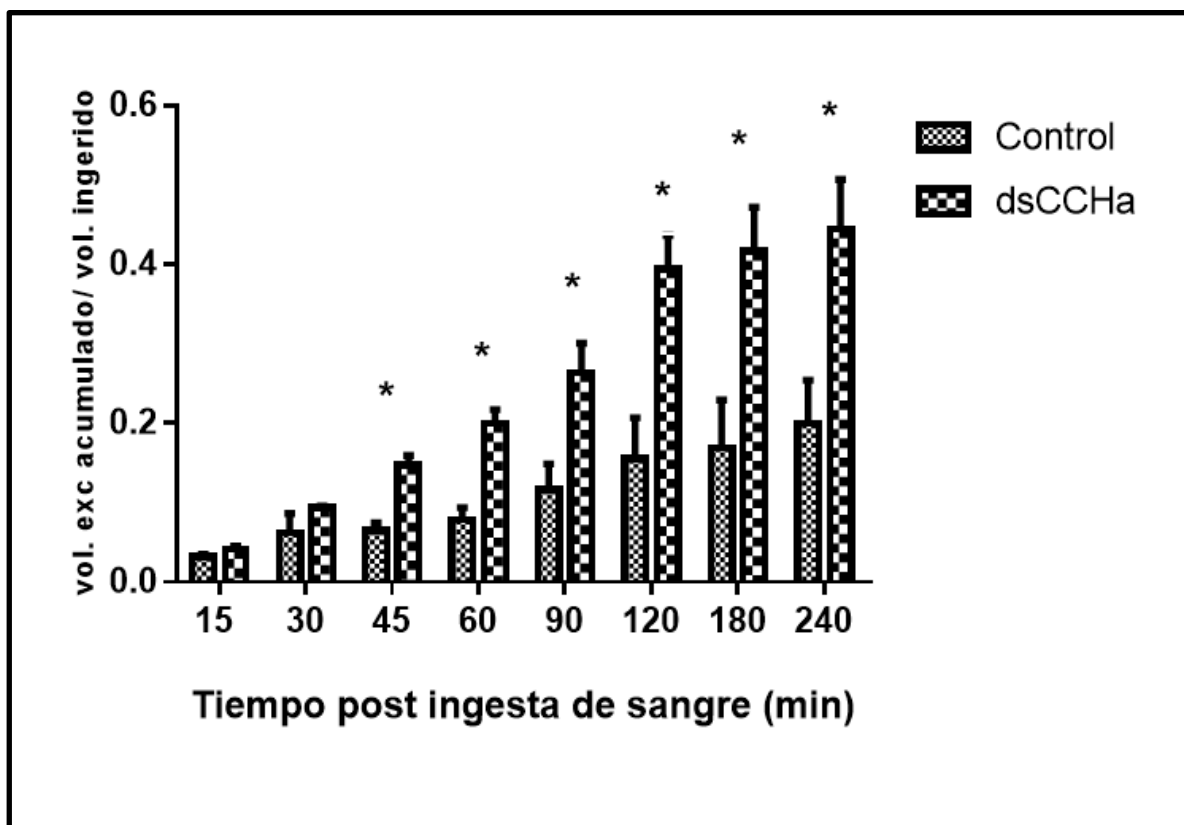


Figura 3.3.8: Silenciamiento del gen CCHamida en ninfas 4º estadio de *R. prolixus*. Se representa el volumen acumulado relativizado al volumen ingerido de sangre en cada tiempo para los grupos control e interferido con dsCCHa. Cada dato representa la media \pm error estándar. *, Indica diferencias significativas, $p < 0,05$

3.3.2.3 Estudio de transporte de fluidos en túbulos de Malpighi en insectos con expresión de CCHa silenciada.

Tanto los insectos del grupo control como del inyectado con dsCCHamida mudaron normalmente a ninfa V. En ese estadio fueron utilizados para evaluar la función secretora de los túbulos de Malpighi a través del ensayo de Ramsay, a fin de corroborar si el silenciamiento en la expresión del gen afectaba a la fisiología del túbulo para responder a 5-HT o al péptido sintético. En la **Figura 3.3.9** se observa el volumen de secreción (nl) de los túbulos de Malpighi para cada grupo luego de la estimulación con 5-HT (10^{-6} M) o CCHa (10^{-6} M) conjuntamente con 5-HT (10^{-6} M).

De acuerdo con lo observado en los experimentos presentados en el Capítulo 2, CCHamida en sinergismo con 5-HT estimula la actividad diurética de los túbulos de Malpighi aislados (ANOVA de un Factor, Test Tukey Kramer $p < 0,05$). Sin embargo, no

se observaron diferencias entre insectos tratados con dsCCHa y el grupo control (n=9,10; p=0,6778 y p=0,54442) (**Figura 3.3.9**).

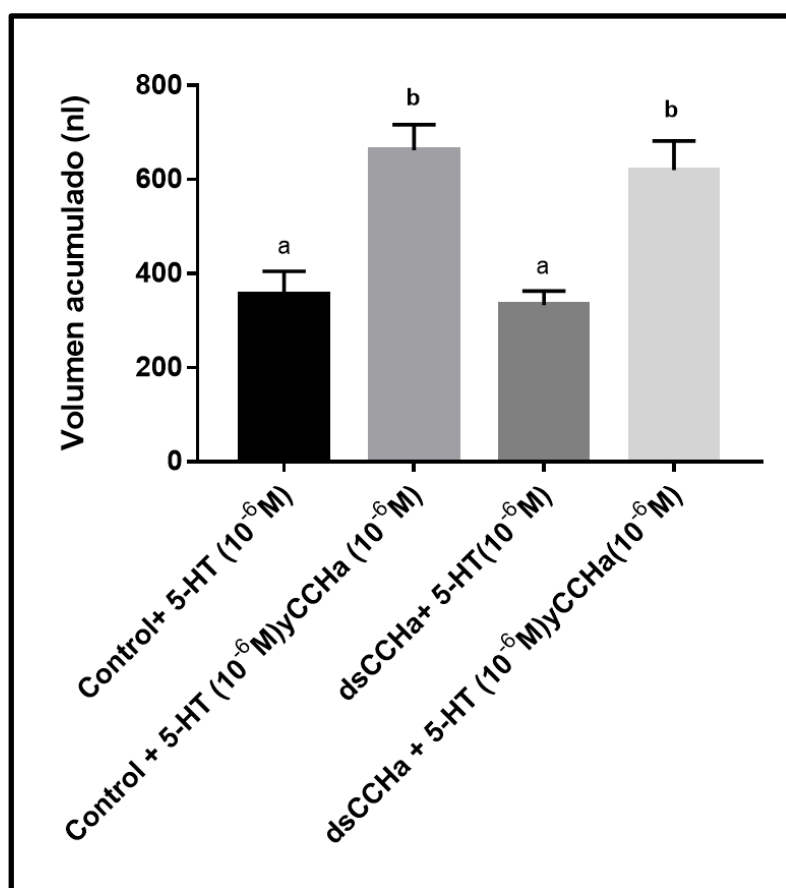


Figura 3.3.9: Ensayo de Ramsay. Se observa el volumen de secreción (nl) de los tubulos de Malpighi para cada grupo luego de la estimulación con 5-HT (10^{-6} M) o CCHa (10^{-6} M) y 5-HT (10^{-6} M). ANOVA, Test Tukey Kramer, letras distintas indican diferencias significativas, p<0,05.

3.3.2.4 Validación de la caída de transcripto de CCHa mediante qRT-PCR

Se evaluó mediante qRT-PCR la eficiencia del silenciamiento génico conseguida mediante RNAi. Como consecuencia del tratamiento con dsCCHa, los niveles de ARNm se redujeron un 85% respecto de los controles (n=3) (**Figura 3.3.10**).

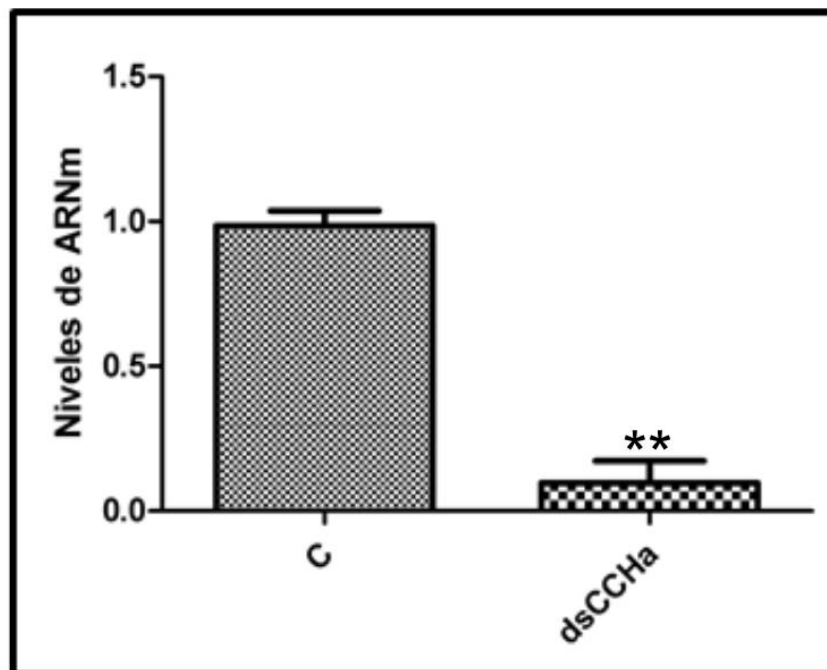


Figura 3.3.10: Efecto del silenciamiento mediante ARNi en los niveles de ARNm de *RhoprCCHA*. C: control, dsCCHA (n=3). t-Student, $p < 0,01$, **: indica diferencias muy significativas.

3.3.2.5 CCHamida regula el transporte de fluidos en intestino medio anterior

Los resultados del ensayo de Ramsay con CCHamida en túbulos de Malpighi de *R. prolixus* sugieren para este péptido una actividad neta diurética en sinergismo con 5-HT. Sin embargo, los resultados del silenciamiento del gen muestran que los insectos que expresaron niveles reducidos de *RhoprCCHamida* excretaron un mayor volumen que los del grupo control, lo que indicaría una actividad neta antidiurética. Es interesante remarcar que los efectos son opuestos según se analicen los primeros 45 minutos tras la ingesta (efecto anti diurético de CCHA), o las últimas dos horas (efecto diurético de CCHA). Los resultados nos llevaron a plantear como hipótesis que *RhoprCCHA* podría tener un efecto antidiurético en el intestino medio anterior, opuesto al efecto diurético observado en los túbulos de Malpighi.

Se estudió el transporte de fluidos en intestino anterior de insectos en estadio de ninfa V de *R. prolixus* (3 semanas post muda). Brevemente, el ensayo consistió en aislar

el intestino anterior de los insectos, lavarlo y estabilizarlo en solución salina por 5 min. Se ligó el extremo posterior de la estructura con un hilo de seda, y se inyectó solución salina coloreada, a fin de descartar filtraciones (ver Métodos para un detalle de la aproximación experimental). Posteriormente se ligó el extremo anterior, generando de esta manera un saco cerrado por sus dos extremos. El preparado fue pesado en una balanza de precisión e incubado en solución salina bajo diferentes condiciones experimentales: a) solución salina, b) 5-HT (10^{-7} M), c) CCHa (10^{-6} M) o d) 5-HT (10^{-7} M) + CCHa (10^{-6} M). Luego de 1 hora, se volvió a pesar cada preparado. La diferencia entre ambos pesos fue utilizada para calcular el volumen de solución salina transportada. En concordancia con resultados previamente publicados (Ianowski *et al.*, 2009), la 5-HT en concentración de 0,1 μ M estimuló el transporte de fluidos desde el lumen del intestino anterior hacia el medio (aproximadamente 0,1 μ l/min) (n=10; p<0,001 respecto al tratamiento con solución salina). El tratamiento del tejido con CCHa por sí solo no tuvo efecto en la tasa de transporte de fluidos (n=11; p=0,987). Sin embargo, CCHamida fue capaz de revertir la estimulación de la absorción evocada por 5-HT (n=11; p=0,7758 respecto al tratamiento con solución salina; p<0,001 respecto al tratamiento con 5-HT sola). Los resultados refuerzan la hipótesis de un efecto antidiurético de *RhoprCCHamida* en el intestino medio anterior.

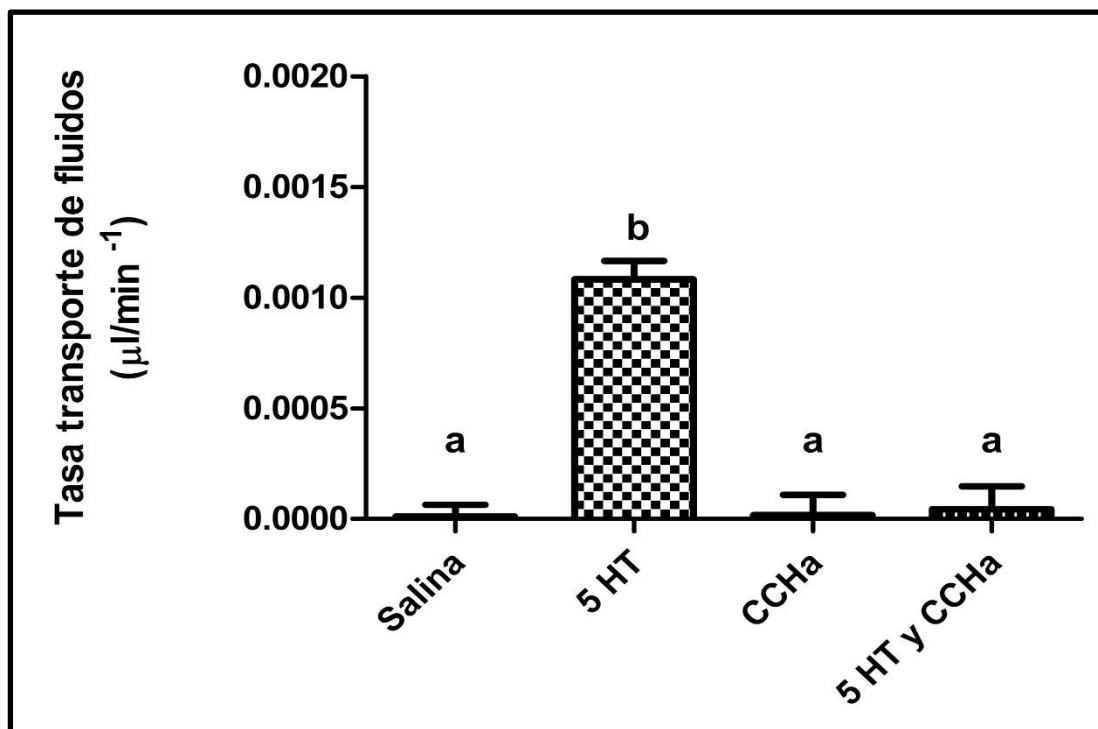


Figura 3.3.11: Efecto de CCHa en la tasa de transporte de fluidos en intestino anterior de ninfas V de *R. prolixus*. El intestino anterior fue incubado con salina (n=8), 5-HT 10^{-7} M (n=10), CCHa 10^{-7} M (n=11) y 5-HT 10^{-7} M + CCHa 10^{-7} M (n=11). (ANOVA, Tukey Kramer, $p < 0,05$). Letras diferentes muestran diferencias significativas.

3.3.2.6 Estudio de la acción cardioregulatoria de CCHamida

Se evaluó la actividad cardioregulatoria de CCHamida en ninfas de V estadio de *R. prolixus*. A la dosis ensayada ($1 \mu\text{M}$) no se encontraron diferencias significativas respecto a su control con solución salina (n=12; $p=0,302$) (Figura 3.3.12).

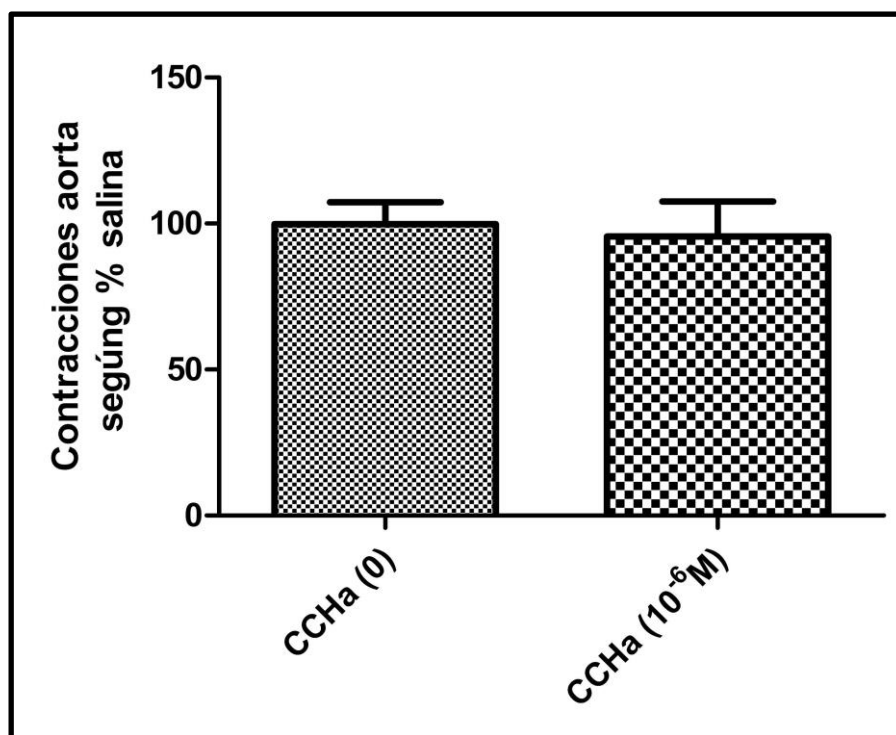


Figura 3.3.12: Actividad cardioregulatoria de *RhoprCCHa* relativizando a salina 100%, ANOVA de un factor, $p < 0,302$.

En vista de los resultados obtenidos en el ensayo de transporte de fluidos en intestino medio anterior, se decidió evaluar la acción mioregulatoria del CCHamida en esta estructura. En la **Figura 3.3.13** se muestra la variación en las contracciones del tejido estudiado relativizado a las contracciones basales (en solución salina) para los tratamientos: control con 5-HT a concentración 10^{-7} M (n=10), CCHa a concentraciones crecientes de 10^{-9} a 10^{-5} M (n=10) y CCHa a concentraciones crecientes de 10^{-9} a 10^{-5} M

con 5-HT 10^{-7} M (n=10). No existen diferencias significativas en la actividad contráctil del tejido en presencia de CCHamida. Cuando analizamos el efecto de CCHamida en el tejido pretratado con 5-HT 10^{-7} M, pudimos observar una disminución en las contracciones respecto al tratado con 5-HT sola. Las diferencias resultaron significativas a concentraciones de 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} M (Anova de dos factores, n=10; $p<0,05$). Los resultados indican un efecto mioinhibidor de CCHa en intestino anterior, con actividad de revertir el efecto estimulador de 5-HT.

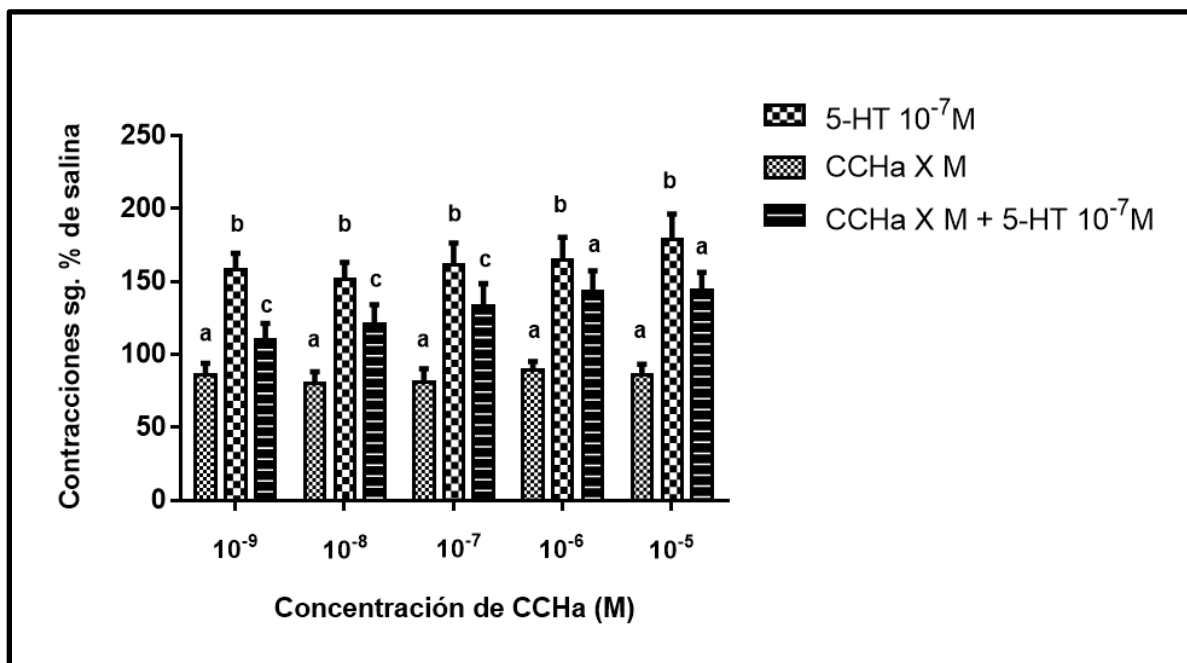


Figura 3.3.13: Actividad mioregulatoria de *RhoprCCHa* relativizada a salina 100%. Se muestra el efecto de los tratamientos: 5-HT 10^{-7} M, CCHa y CCHa+ 5-HT (10^{-7} M) en intestino anterior, para cada caso n=10. ANOVA de 2 factores para medidas repetidas, Test de Tukey Kramer, $p<0,05$. Letras diferentes indican diferencias significativas.

3.3.3 Discusión

La función de CCHamida en insectos ha sido escasamente estudiada, hasta el presente sólo se había reportado su efecto orexigénico en las especies *B. mori* (Roller *et al.*, 2008) y *D. melanogaster* (Hansen *et al.*, 2011; Veenstra *et al.*, 2014).

En este trabajo caracterizamos el perfil de expresión de *RhoprCCHa* y sus receptores putativos por RT-PCR y determinamos que CCHamida se expresa en estructuras involucradas a la diuresis y la digestión del insecto: túbulos de Malpighi,

intestino anterior e intestino medio. Es interesante señalar que es uno de los pocos péptidos que se ha encontrado expresado en túbulos de Malpighi. Hasta el momento, solo se tenía el reporte de que *RhoprFGLamida AST* se expresa levemente en túbulos de Malpighi y que además co-expresa con péptidos relacionados a la diuresis en el SNC; por este motivo se le atribuyó un posible papel en esta función. Sin embargo, no tiene efecto en la tasa de transporte de agua en el intestino anterior o en la tasa de secreción de los túbulos de Malpighi (Zandawala y Orchard, 2013); por lo que se supone que solo actúan en la coordinación del músculo visceral y cardíaco durante los procesos posteriores a la alimentación.

A través del silenciamiento del gen por ARNi hemos conseguido determinar un efecto dual del neuropéptido a distintos tiempos post ingesta de sangre. Los resultados apuntan a una inhibición de la diuresis inmediata (primeros 45 min) y una estimulación hacia el final del proceso (desde los 90 a los 240 min).

Los ensayos *in vitro* demostraron que la actividad dual observada para CCHamida puede deberse a un efecto opuesto en los túbulos de Malpighi (actividad diurética) y el intestino medio anterior (actividad anti diurética). Si bien se han descrito otros casos de péptidos con actividad diurética (Te Brugge *et al.*, 2009, 2011) o antidiurética (Ianowski *et al.*, 2010; Paluzzi *et al.*, 2008, 2012; Te Brugge *et al.*, 2011) en *R. prolixus*, siempre los efectos fueron concordantes tanto en túbulos de Malpighi como en intestino medio anterior. Por lo tanto, CCHamida es el primer neuropéptido en que se observa este efecto opuesto en ambas estructuras.

La fisiología de estos insectos hematófagos hace que sean especies donde la diuresis debe ser regulada y ajustada temporalmente de manera muy estricta. Después de una ingesta voluminosa de sangre, el insecto debe excretar rápidamente grandes volúmenes de líquido. Sin embargo, en los largos períodos de digestión entre ingestas, los insectos prácticamente no excretan, y los procesos de inhibición de la diuresis resultan fundamentales (Coast., 2009). La coordinación entre la actividad del intestino anterior (implicado en la reabsorción de agua y la digestión) y túbulos de Malpighi (implicados en excreción) resulta fundamental. Es por lo tanto esperable que existan hormonas que sean activas en ambas estructuras. En el caso de CCHamida, puesto que es expresada localmente tanto en túbulos de Malpighi como en intestino medio anterior, la regulación de su expresión en cada estructura podría responder a requerimientos de cada momento y situación fisiológica del insecto. El efecto opuesto en ambas estructuras podría permitir que el sistema regule los volúmenes excretados de manera más fina, y así evitar excesos

o defectos en la diuresis que pondrían en peligro la homeostasis y la vida del insecto. Los mecanismos de regulación fisiológica de CCHamida en *R. prolixus* serán profundizados en el laboratorio con posterioridad a la finalización de la presente Tesis Doctoral, así como la finalización de un manuscrito en preparación reportando los resultados. La implicación de *RhoprCCHa* en la diuresis, con un efecto dependiente de la estructura, se destaca como un resultado de alta relevancia dentro del presente trabajo.

3.4 Capítulo 4. Neuropéptidos reguladores de la actividad miotrópica en *R. prolixus*.

Hipótesis:

Los neuropéptidos Orcokinina B y neuropéptido F corto (sNPF) tienen un papel miotrópico en aorta y/o intestino medio en *R. prolixus*.

Objetivos específicos del Capítulo 4:

- Evaluar la actividad de los péptidos sNPF y Orcokinina A y B sobre la frecuencia de las contracciones de la arteria dorsal e intestino anterior.
- Estudiar el papel de análogos peptídicos de sNPF a fin de evaluar hipótesis sobre la relación estructura-función.

3.4.1 Introducción

La diuresis es coordinada por la actividad excretora de los túbulos de Malpighi, el aumento de la frecuencia de las contracciones en el corazón, las ondas peristálticas y la reabsorción de agua por intestino medio anterior; los neuropéptidos están implicados en la regulación de todos esos procesos (Coast, 2009). Muchos neuropéptidos implicados centralmente en distintos procesos tienen paralelamente una actividad miotrópica sobre la aorta y/o el intestino medio anterior (Ons, 2017).

Aquí nos propusimos evaluar el papel de neuropéptidos codificados en los precursores *RhoprOKA*, *RhoprOKB* y *RhoprsNPF* en la actividad miorreguladora o

cardioregulatoria de *R. prolixus*. Asimismo, estudiamos el papel de análogos peptídicos de sNPF; truncados en la región amino-terminal del péptido; como modo de corroborar la hipótesis sobre la relación estructura-función entre el neuropéptido y su receptor.

Un péptido bioactivo de secuencia NFDEIDRSGFGFN fue identificado por primera vez en extractos del cordón nervioso abdominal del cangrejo *O. limosus* (Stangier *et al.*, 1992). Por su actividad mioestimuladora del recto, los péptidos de esta familia fueron denominados Orcokinininas (OKs). Hasta el año 2004, cuando una OK fue identificada en la cucaracha *Blattella germanica* (Pascual *et al* 2004), se creía que estos péptidos eran exclusivos de crustáceos. Ensayos *in vitro* con el péptido de *B. germanica* (NFDEIDRSGFNS) y su ortólogo de crustáceos (NFDEIDRSGFGFN) en intestino medio y recto aislados de *B. germánica* no mostraron un efecto miotrópico significativo a concentraciones de 10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-6} M. Actualmente se sabe que las OKs son una familia de neuropéptidos altamente conservada, presente en todas las especies de insectos estudiadas.

En el año 2012, nuestro grupo de trabajo reportó por primera vez una nueva familia de neuropéptidos en insectos, que es codificada en el mismo gen que OKs (Sterkel *et al.*, 2012). Así, el gen precursor de OKs en insectos da origen a dos isoformas, que fueron llamadas Orcokinina A (OKA) y Orcokinina B (OKB). Tanto OKA como OKB tienen un alto grado de conservación evolutiva, y están presentes en todas las especies de insectos estudiadas. Sin embargo, las dos isoformas del gen difieren a nivel de secuencia, patrón de expresión y papel en la regulación fisiológica (Sterkel *et al.*, 2012; Wulff *et al.*, 2017). Recientemente hemos identificado una nueva isoforma del gen (OKC), que solamente fue caracterizada hasta el momento en *R. prolixus*. *RhoprOKB* y *RhoprOKC* codifican los mismos péptidos conservados; *RhoprOKC* codifica dos péptidos espaciadores extra, que no tendrían un papel fisiológico central de acuerdo con la teoría (Wegener y Gorbashov, 2008; Wulff *et al.* 2017).

A pesar de su alto nivel de conservación entre especies, el papel fisiológico de OKs fue poco estudiado hasta la fecha. Para OKA se ha reportado un papel protoracicotrópico en el lepidóptero *B. mori* (Yamanaka *et al.*, 2011) y en la regulación de la actividad locomotora circadiana en la cucaracha *L. maderae* (Hofer e Homberg, 2006a;b). Para ambas isoformas en conjunto se describió un rol en la regulación de la vitelogénesis en *B. germanica* (Ons *et al.*, 2015), y un comportamiento innato de escape denominado “awaking” en *T. castaneum* (Jiang, Kim *et al.* 2015). Más recientemente,

nuestro grupo de trabajo reportó un papel central de OKA, y secundario para OKB, en la regulación de la ecdisis en *R. prolixus* (Wulff *et al.*, 2017).

Dado que muchos péptidos reguladores de la ecdisis también tienen un papel cardioestimulador (como por ejemplo CCAP (Lee y Lange 2011) y Corazonina (Patel Orchard *et al.*, 2014), nos propusimos estudiar el rol de *RhoprOKA* y *RhoprOKB* en la contractibilidad de la aorta de *R. prolixus*, como parte de la caracterización funcional de *RhoprOKs*. Además, la expresión de este gen fue reportada en intestino (solo las isoformas *RhoprOKB* y *RhoprOKC*) y gónadas (*RhoprOKA* y *RhoprOKB*) (Wulff *et al.*, 2017), lo cual sugiere que posee otras funciones (pleiotrópico), además de la regulación de la ecdisis. Por este motivo, también evaluamos la función contráctil del intestino anterior en presencia de *RhoprOKA* y *RhoprOKB*.

En la **Figura 3.4.1 A) y B)** se muestran las secuencias del gen precursor y los péptidos sintéticos utilizados para *RhoprOKA* y *RhoprOKB*.

A)



Figura 3.4.1 A): Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *RhoprOKA*. El péptido señal se muestra en recuadrado. Los sitios de clivaje se muestran subrayados. El péptido sintético utilizado se muestra en un recuadro negro de línea cortada.

B)

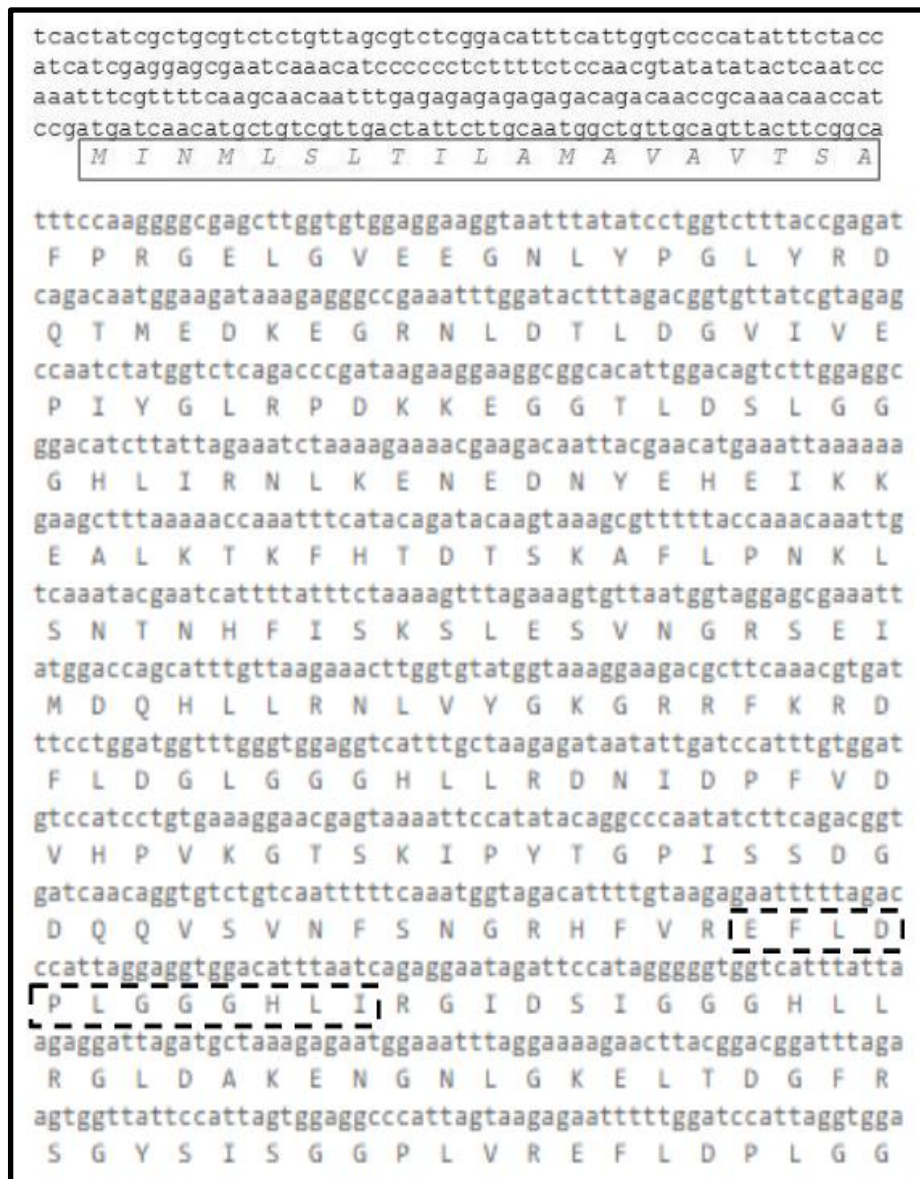


Figura 3.4.1 B): Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *RhoprOKA*. El péptido señal se muestra en recuadrado. El péptido sintético utilizado se muestra en un recuadro negro de línea cortada

Por su parte, los **neuropéptidos F** de insectos se pueden dividir en dos grupos: NPF cortos (sNPF) y largos (LNF) (Brown *et al.*, 1999). Estos péptidos participan en la regulación del comportamiento de alimentación y la digestión (Broeck *et al.*, 2001). Los receptores de péptidos NPF se han identificado en *D. melanogaster* (Brown *et al.*, 1999), *Ae. aegypti* (Stanek *et al.*, 2006), *An. gambiae* (Garczynski *et al.*, 2005) y *R. prolixus* (Ons *et al.*, 2016), entre otras especies, y poseen una gran similitud con los receptores para NPY de humanos (Chowańsk *et al.*, 2016). Todos los sNPF identificados se caracterizan por una región C-terminal **K-X1-R-X2-amida**, donde el primer aminoácido es básico (Arg o Lys), X1 puede ser Pro, Thr o Leu, y X2 es siempre un residuo de aminoácido aromático, tal como Trp (Chowańsk *et al.*, 2016). Los neuropéptidos F cortos han demostrado tener actividad pleiotrópica en muchos tejidos. Por ejemplo, Lepde-NPF-1 y Schgr-NPF han demostrado una alta actividad gonadotrópica al estimular el desarrollo de huevos en langostas y también al aumentar concentraciones de vitelogenina en la hemolinfa (Schoofs *et al.*, 2001).

Los neuropéptidos cortos F también desempeñan papeles fisiológicos en la regulación de los ritmos cardíacos de insectos. Se ha demostrado en bioensayos *in vitro* que Lepde-NPF-I actúa como potente cardioinhibidor de en dos escarabajos, *T. molitor* y *Z. atratus*. La aplicación de este péptido a corazones semi-aislados en ambas especies causó una reducción rápida, dosis dependiente y reversible de la frecuencia cardíaca (efecto cronotrópico negativo). A concentraciones farmacológicas (10^{-5} M), el efecto del péptido se manifestó como una detención completa de la actividad miocárdica en la fase diastólica del ciclo de contracciones. Los efectos cardioinhibitorios de sNPF también se ha demostrado en otros insectos. Setzu, et al. (2013) realizaron pruebas *in vivo* de sNPF-1 (AQRSPSLRLRFa) con corazones de *P. terraenovae*. Mediante la utilización de electrocardiografía demostraron que el péptido causó la detención de las contracciones del corazón en un rango de concentraciones (de 10^{-7} a 10^{-5} M), pero solo en la fase lenta de los ritmos cardíacos; mientras que aumentó la duración de la fase rápida de manera dosis independiente y cambió la frecuencia de las contracciones. Estos autores sugieren que sNPF solo afecta a la fase lenta, que tienen efectos duraderos y dependientes de la dosis, y que los cambios inducidos en la fase rápida se deben a alteraciones de la fase lenta, y no un efecto directo del péptido (Setzu *et al.*, 2013). Estos resultados muestran que sNPF juegan un papel crucial en la regulación de los ritmos cardíacos en insectos.

En base a la evidencia antes mencionada nos propusimos estudiar el efecto del péptido en ensayos *in vitro* en *R. prolixus* y a través de análogos peptídicos, diseñados en

colaboración con la Dra. Ruthann Nichols (Univ. de Michigan, USA), conocer la región mínima de la secuencia necesaria para su interacción con el receptor. Este tipo de estudios resulta interesante en el contexto del diseño de análogos peptídicos de neuropéptidos de insectos, que puedan ser utilizados a futuro en el control de especies perjudiciales.

En la **Figura 3.4.2** se muestra las secuencias del gen precursor de *R. prolixus* y el péptido sintético utilizado para *Rhoprs*NPF.



Figura 3.4.2: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de *Rhoprs*NPF. El péptido señal se muestra en recuadrado. Los sitios de clivaje se muestran subrayados. El residuo Gly necesario para la amidación en el extremo C-terminal del péptido maduro se muestra con un círculo. El péptido sintético utilizado se muestra en un recuadro negro de línea cortada.

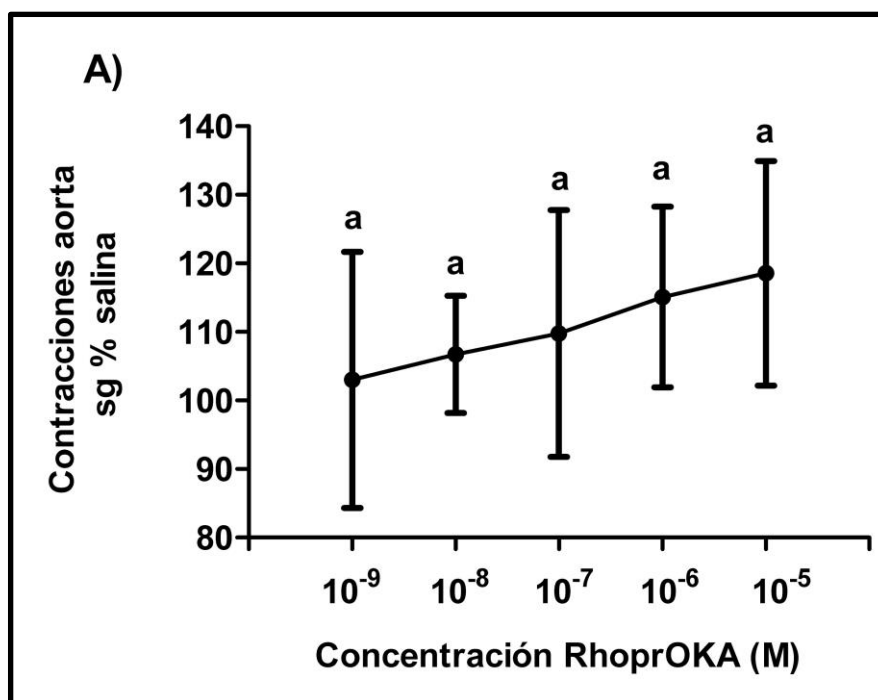
3.4.2 Resultados

3.4.2.1 Orcoquininas: estudio de su acción cardio- y miotrópica.

Se estudió el efecto de dos péptidos conservados, uno de la familia OKA, codificado en el precursor *Rhopr*OKA, y el otro de la familia OKB, codificado en el precursor *Rhopr*OKB. Se encontró un aumento de la actividad contráctil de la aorta para *Rhopr*OKA, de alrededor del 15% (10^{-5} M) respecto de la actividad basal (**Figura 3.4.3**

A). Para *RhoprOKB* el aumento en la frecuencia de contracciones fue de un 20 %, a una concentración 10^{-5} M (la más alta evaluada), respecto de la actividad basal (**Figura 3.4.3 B**).

Si bien la estimulación de la actividad cardíaca por *RhoprOKA* es relativamente baja y no significativa en el análisis estadístico (ANOVA de medidas repetidas, $n=7$;) el aumento en la frecuencia de contracciones es mayor a dosis más altas del péptido (**Figura 3.4.3 A**). Para el caso de *RhoprOKB* se observó un aumento de la frecuencia cardíaca en todas las concentraciones estudiadas, salvo en 10^{-8} M. En el análisis estadístico observamos que existen diferencias significativas entre la concentración de 10^{-8} con las concentraciones de 10^{-7} y 10^{-6} M (ANOVA de medidas repetidas, contrastes de Bonferroni; $p<0,05$; $n=7$) (**Figura 3.4.3 B**).



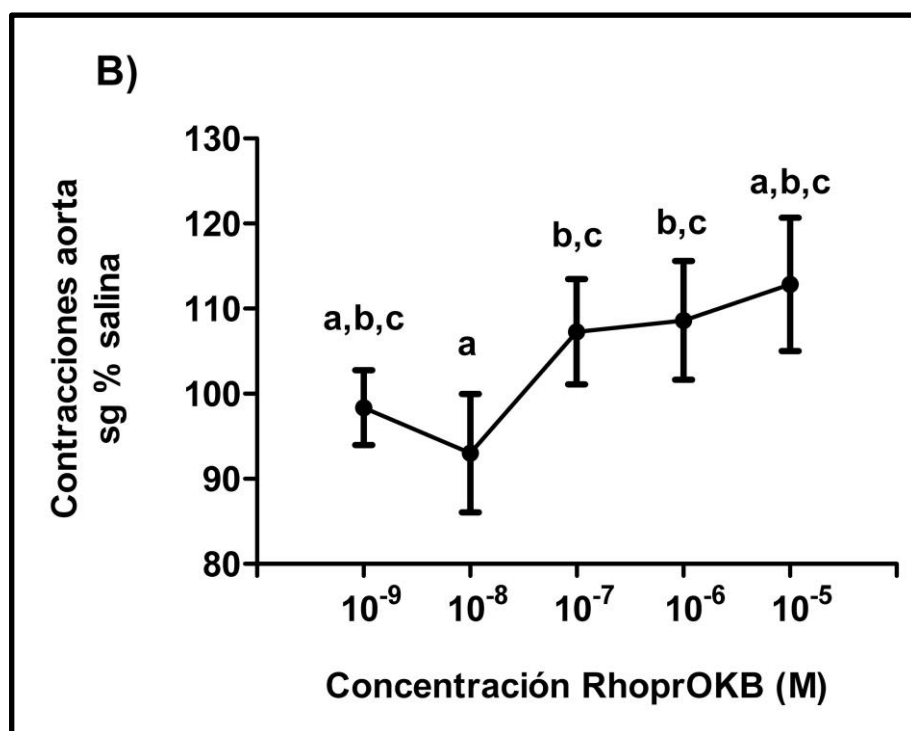


Figura 3.4.3: A) Actividad cardioregulatoria de *RhoprOKA* relativizada a salina 100%, ANOVA para medidas repetidas, $p=0,489$). Letras distintas indican diferencias significativas. **B)** Actividad cardioregulatoria de *RhoprOKB* relativizada a salina 100%, ANOVA para medidas repetidas, $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencias significativas.

Posteriormente, se realizaron los ensayos adicionando ambos neuropéptidos a concentraciones equivalentes. Se pudo determinar un efecto mayor que con la adición de cada péptido de manera separada. A concentraciones de 10^{-7}M , 10^{-6}M y 10^{-5}M se presentan diferencias significativas respecto a las contracciones basales (ANOVA de medidas repetidas, contrastes de Bonferroni; $p < 0,05$; $n=10$). Lo anterior sugiere un efecto sinérgico de ambas isoformas de en la regulación de la actividad cardíaca (**Figura 3.4.4**).

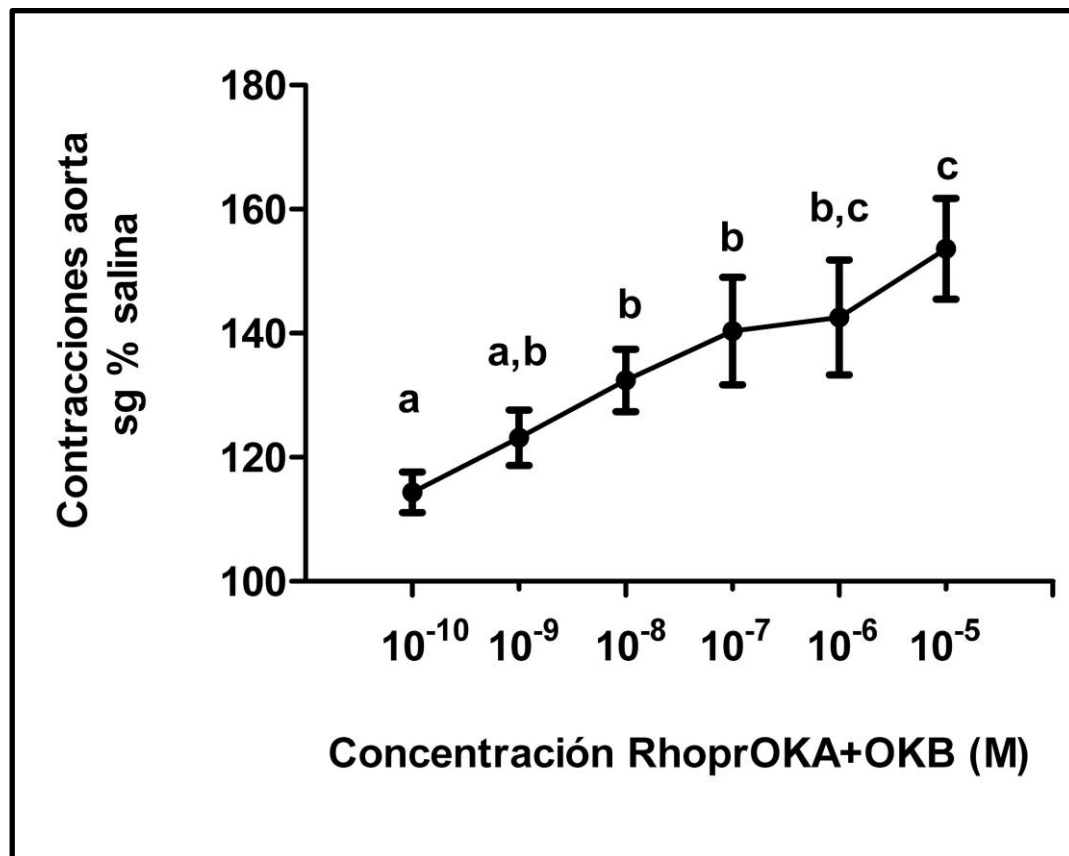
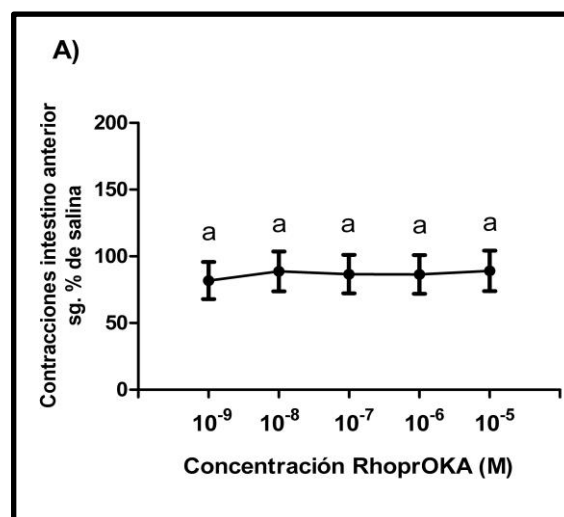


Figura 3.4.4: Actividad cardioregulatoria de *RhoprOKA* + *RhoprOKB* relativizada a salina 100%, ANOVA para medidas repetidas, $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencias significativas.

Se observó un aumento dosis-dependiente en la frecuencia de contracciones peristálticas espontáneas del intestino medio anterior en los bioensayos para *RhoprOKB* (Anova de medidas repetidas; contrastes de Bonferroni; $p < 0,05$; $n = 7$), pero no para *RhoprOKA* ($n = 7$) (**Figura 3.4.5 A y B**).



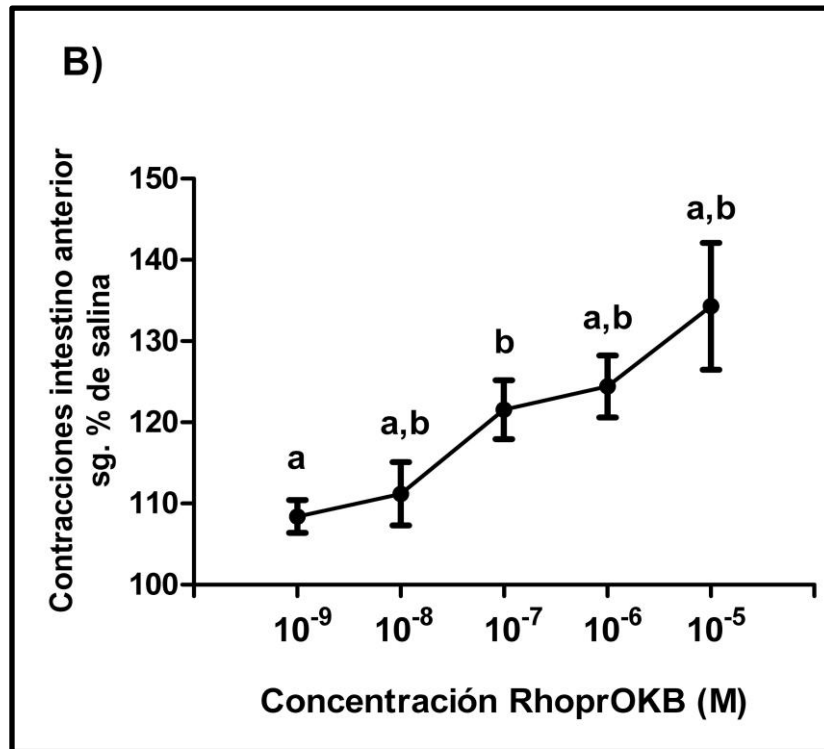


Figura 3.4.5: A) Actividad mioregulatoria de *RhoprOKA* relativizada a salina 100%, ANOVA para medidas repetidas, $p=0,108$. B) Actividad mioregulatoria de *RhoprOKB* relativizada a salina 100%, ANOVA para medidas repetidas, $p<0,05$. Letras distintas indican diferencias significativas.

3.4.2.2 sNPF y su rol en la contracción de tejidos. Estudio de análogos peptídicos de sNPF.

Se estudió el efecto de sNPF en la actividad contráctil de la aorta con una concentración del neuropéptido de 10^{-6} M. Se pudo determinar un efecto cardioinhibidor, con una reducción de un 40-50% en la frecuencia de contracción de la aorta ($p < 0,001$; $n=6$;) (Figura 3.4.6).

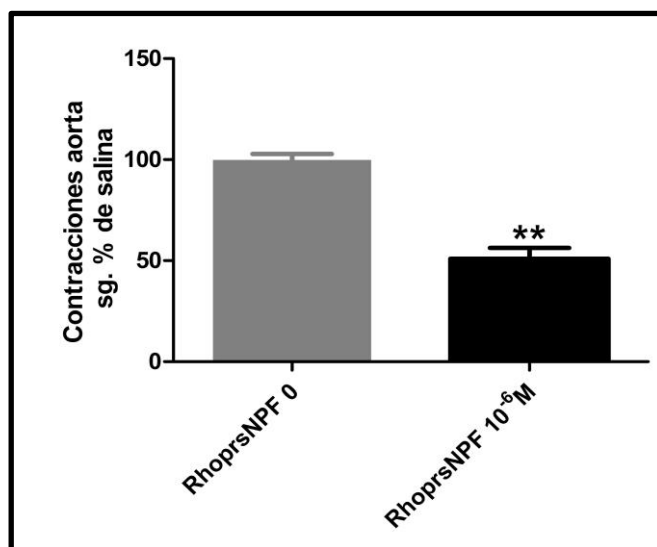


Figura 3.4.6: Actividad cardioregulatoria de *RhoprNPF* relativizada a salina 100%, ANOVA de un factor $n=6$; $p < 0,001$. **, indica diferencias significativas.

Posteriormente, se evaluó el efecto de sNPF en concentraciones crecientes (Figura 3.4.7). Desde la concentración más baja ensayada (10^{-9} M) se observó una disminución en las contracciones, que aumentó con la dosis y resultó estadísticamente significativa a una concentración de 10^{-7} M (ANOVA de medidas repetidas con contrastes de bonferroni; $p < 0,05$; $n=10$.). A concentraciones más altas (10^{-6} y 10^{-5} M) la tasa de contracciones se estabiliza, y aumenta la desviación (Figura 3.4.7).

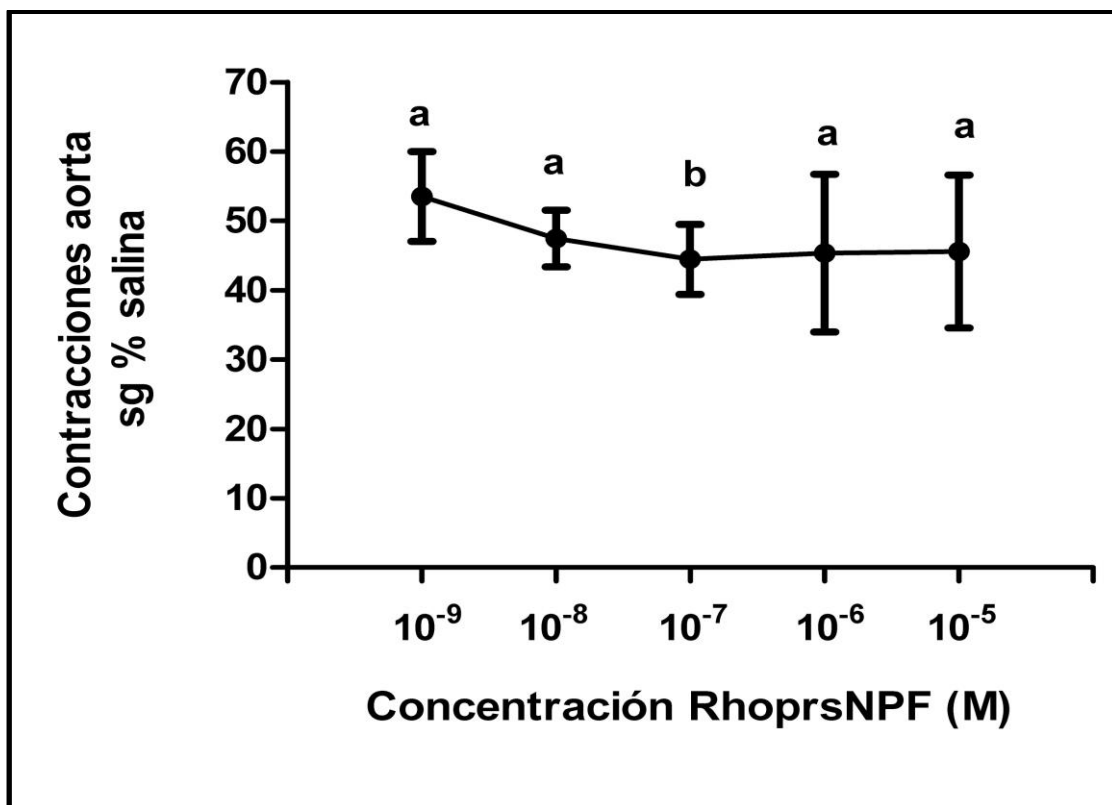


Figura 3.4.7: Actividad cardioregulatoria de *RhoprsNPF* relativizada a salina 100%, ANOVA para medidas repetidas, $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencias significativas.

Además, se analizó la actividad de *RhoprsNPF* en intestino anterior. Se pudo determinar la actividad mioinhibitoria y la reducción de las ondas peristálticas en presencia del péptido. La actividad resultó ser dosis dependiente. A la concentración de 10^{-5} M se observó un marcado descenso ($n=10$; $p < 0,05$) (**Figura 3.4.8**).

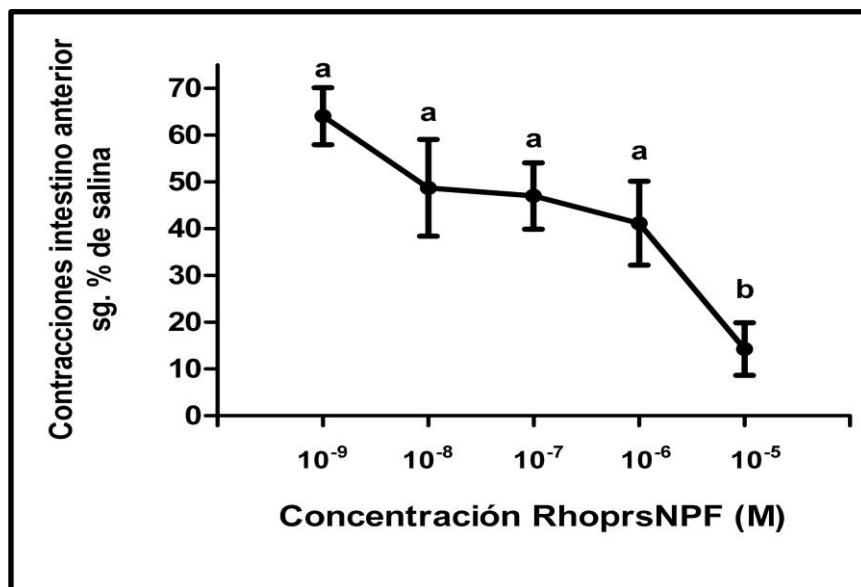


Figura 3.4.8: Actividad mioregulatoria de *RhoprsNPF* relativizada a salina 100%, ANOVA para medidas repetidas, $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencias significativas.

El péptido maduro *RhoprsNPF* es un endecapéptido perteneciente a una familia de péptidos cardioregulatorios (RF-amida), de secuencia **NNRSPQLRLRF-NH₂**, que interactúa con un GPCR específico (Ons *et al.*, 2016). En colaboración con la Dra. Ruthann Nichols (Biological Chemistry Department, University of Michigan Medical School), se realizaron predicciones de interacción ligando-receptor para este péptido. A fin de evaluar dichas predicciones se diseñaron análogos peptídicos truncados en la región amino terminal (**Figura 3.4.9**).

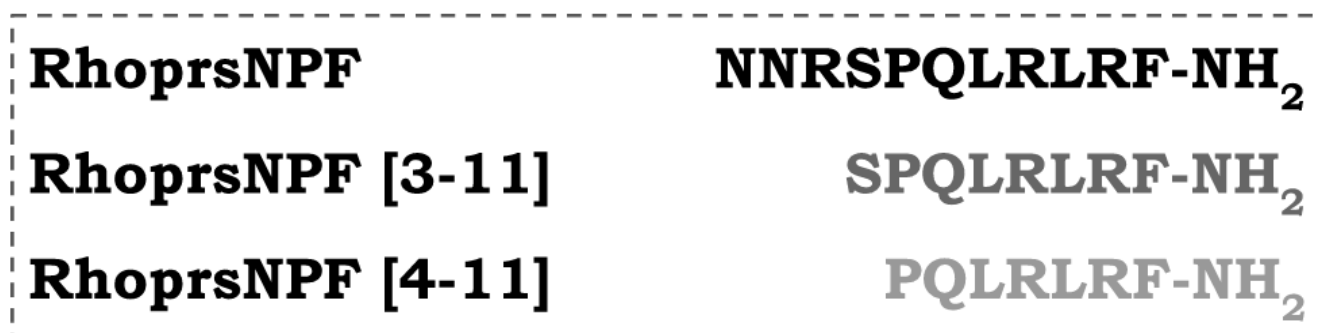


Figura 3.4.9: Secuencia del neuropéptido sNPF y de los análogos [3-11] y [4-11]; utilizados en los bioensayos de contracción de tejidos.

Se estudió la actividad de los análogos mediante bioensayos de contracción de tejidos en aorta e intestino anterior; a fin de evaluar la relevancia de los residuos aminoacídicos en la actividad mioinhibitoria del neuropéptido, y qué parte de la secuencia resulta necesaria para la correcta interacción con el receptor.

En la **Figura 3.4.10** se resumen los resultados que se obtuvieron para tasa de contracción de aorta a una concentración de 10^{-6} M para el péptido y para cada análogo truncado. En la **Figura 3.4.11** se puede observar el efecto de cada análogo en la contractibilidad del tejido a distintas concentraciones. Se pudo determinar que los análogos presentan una actividad similar al neuropéptido completo, aunque el efecto mioinhibitorio resultó ser distinto entre ambos análogos.

Los efectos del péptido sNPF y los análogos sobre la frecuencia cardíaca fueron consistentes en términos globales. En aorta los dos análogos provocaron la misma respuesta cardioinhibidora, aunque el efecto no es el mismo en cuanto a la magnitud de la respuesta a una concentración de 10^{-6} M. Se pudo observar que solo el péptido [3-11] mantuvo su acción cardioinhibidora al igual que el péptido completo, no así el análogo más corto [4-11].

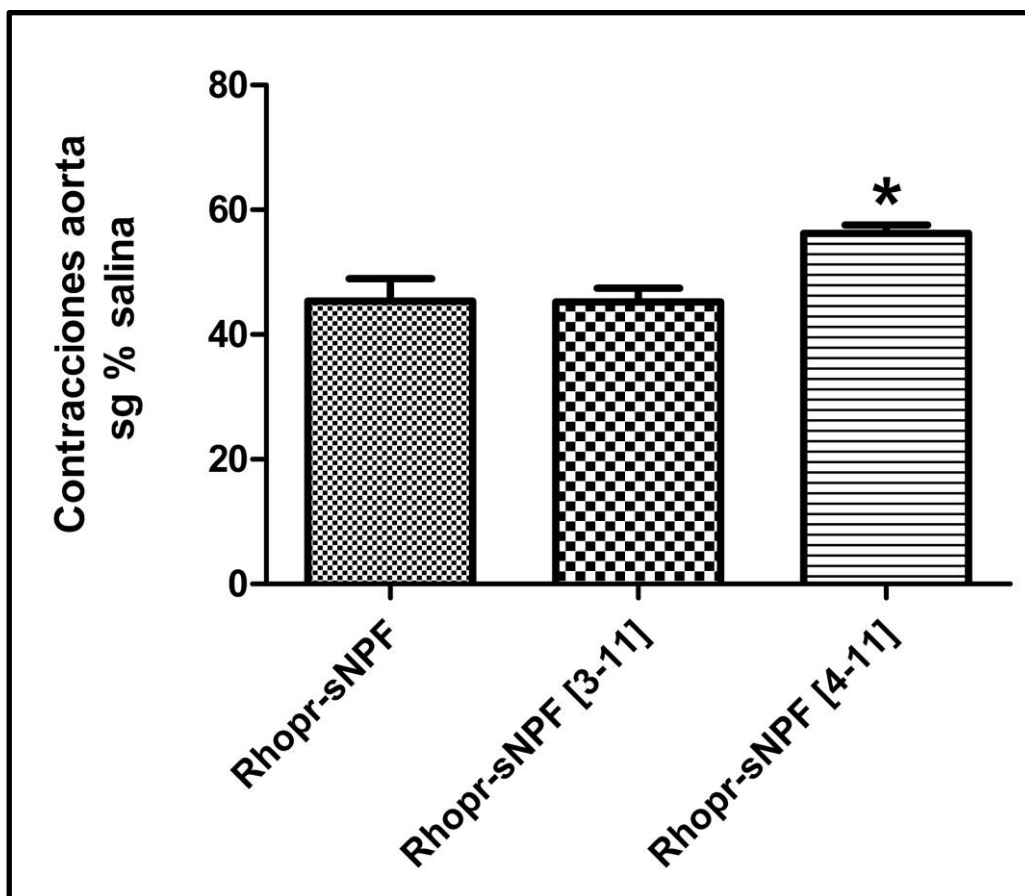


Figura 3.4.10: Efecto de *RhoprsNPF* y sus análogos truncados en la aorta de *R. prolixus*. Se muestra la media \pm S.E.M calculada para una concentración de 1 μ M. ANOVA de un Factor, $p < 0,05$, *, indica diferencias significativas.

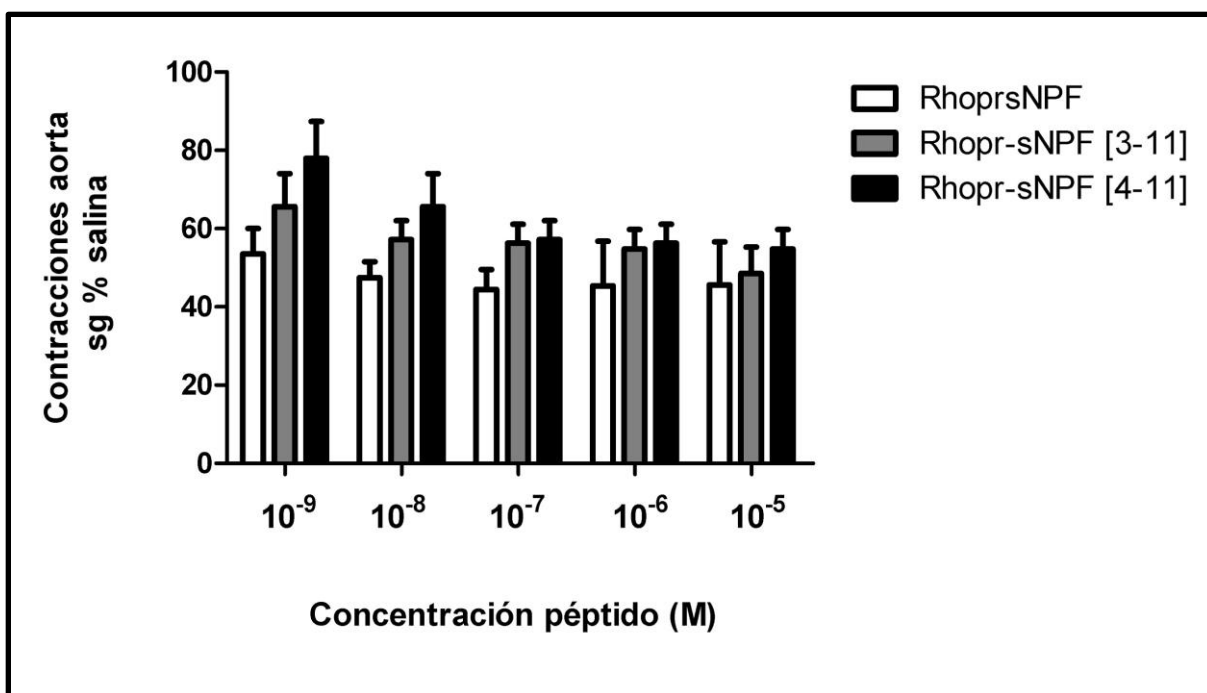


Figura 3.4.11: Gráfico de dosis respuesta para *RhoprsNPF*, *RhoprsNPF* [3-11] y *RhoprsNPF* [4-11] relativizada a salina 100%.

En cuanto al efecto sobre la frecuencia de ondas peristálticas sobre el intestino medio anterior, se observó que los análogos peptídicos [3-11] y [4-11] mantienen un efecto inhibitor. El péptido [3-11] tuvo un efecto inhibitor de las ondas peristálticas un efecto significativamente menor respecto tanto de *RhoprsNPF* completo como del análogo [4-11] (ANOVA de un factor; $p < 0,001$; $n = 10$). Se pudo observar que el análogo [4-11] mantuvo el mismo efecto mioinhibidor que el péptido completo (**Figura 3.4.12 y 3.4.13**)

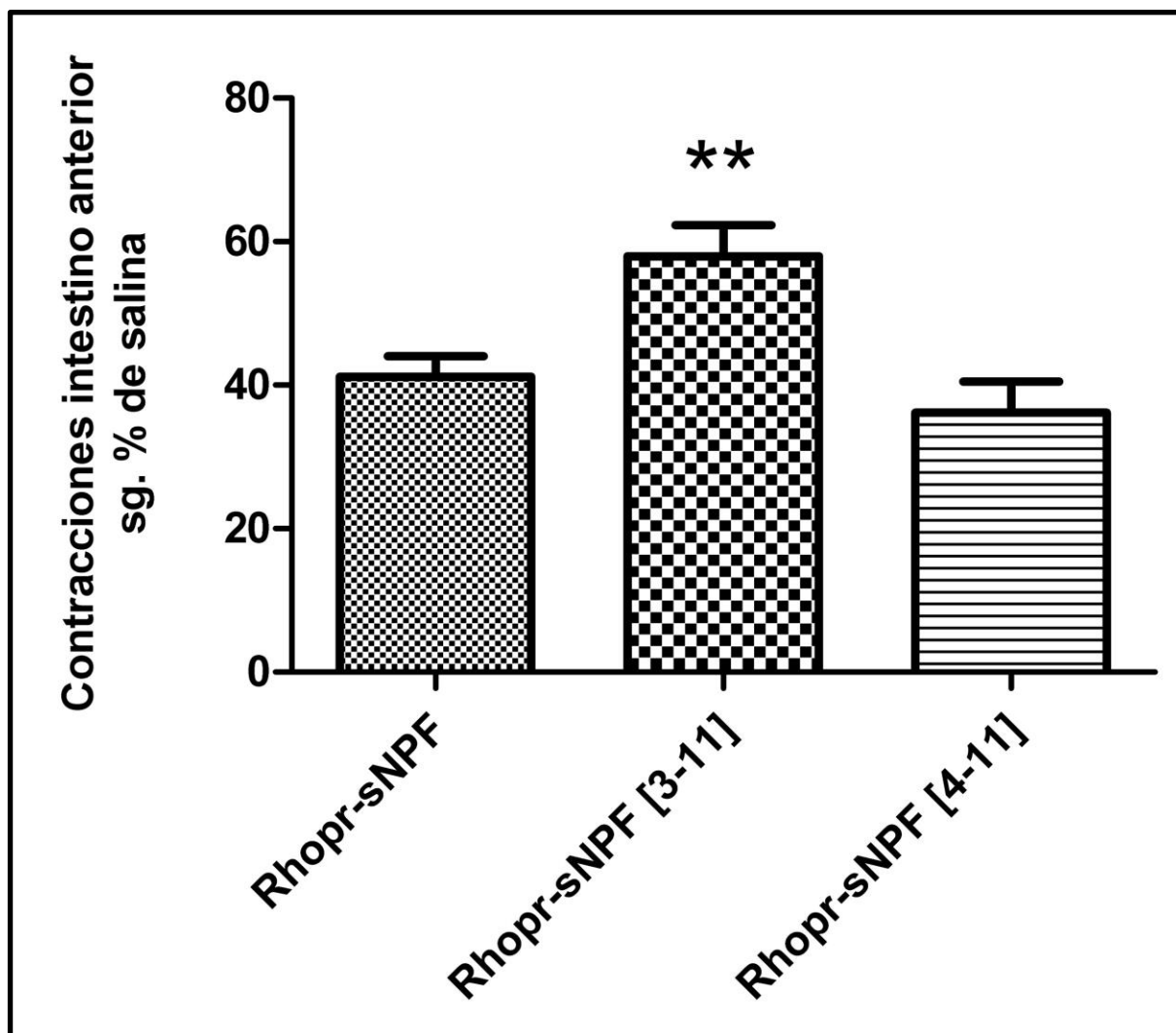


Figura 3.4.12: Efecto de *RhoprsNPF* y sus análogos truncados en el intestino de *R. prolixus*. Se muestra la media \pm S.E.M calculada para una concentración de 1 μ M. ANOVA de un Factor, $p < 0,001$, **, indica diferencias significativas.

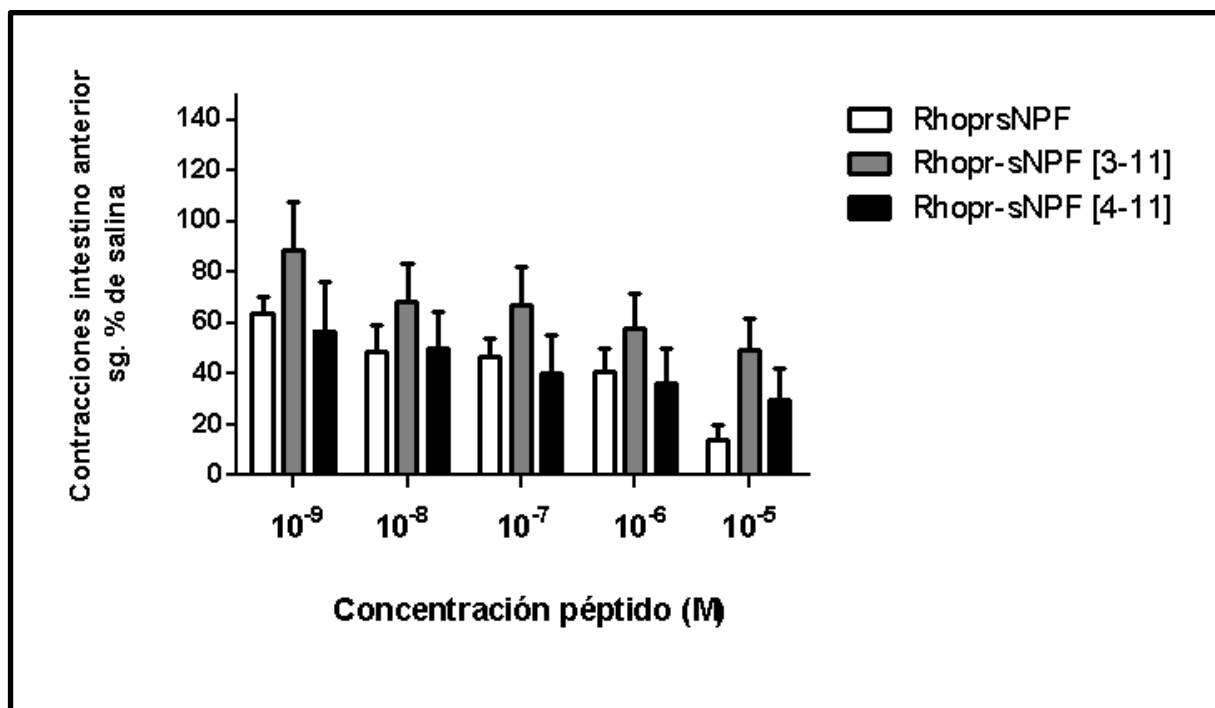


Figura 3.4.13: Gráfico de dosis respuesta en intestino anterior para *RhoprsNPF*, *RhoprsNPF* [3-11] y *RhoprsNPF* [4-11] relativizada a salina 100%.

3.4.3 Discusión

En este trabajo pudimos determinar el efecto cardioacelerador de las *RhoprOKs*, actuando en sinergismo y de manera dosis - dependiente, en la aorta del insecto, lo cual coincide con lo observado para otros neuropéptidos reguladores de la ecdisis (Lee y Lange, 2011; Patel *et al.*, 2014). Además, *RhoprOKB* podría estar involucrado en procesos relacionados con la alimentación y la digestión, ya que se observó un efecto estimulador de las ondas peristálticas en el intestino medio anterior. De hecho, se sabe que OKB es un péptido del intestino en distintas especies, incluida *R. prolixus* (Sterkel *et al.*, 2012). Resultados no publicados indican que los péptidos *RhoprOKB* son liberados desde el intestino medio anterior inmediatamente después de una ingesta de sangre (Wulff *et al* manuscrito en preparación). La implicación del sistema a un tiempo en la regulación de la ecdisis y de la ingesta, podría sugerir un papel en la coordinación del estado nutricional con el desarrollo post-embrionario, procesos que están directamente relacionados en los insectos.

Los péptidos de la familia de sNPF parecen estar implicados en una amplia gama de procesos, incluida la actividad locomotora (Kahsai *et al.*, 2010) y los ritmos circadianos (Johard *et al.*, 2009). Sin embargo, su función principal conservada parece residir en la regulación del comportamiento alimentario (Dillen *et al.*, 2014).

En este trabajo reportamos la función mioinhibitoria de *RhoprsNPF*, sobre la frecuencia de contracciones en aorta y de las ondas peristálticas en intestino anterior de *R. prolixus*. Hasta el momento existían algunos estudios que daban cuenta de la función mioinhibitoria de sNPF en otras especies. Los resultados observados en este trabajo de Tesis dan cuenta de un efecto cardioinhibidor en aorta de manera dosis dependiente en las concentraciones de péptido más bajas. En intestino anterior observamos que el efecto inhibitorio más fuerte se da a una concentración de 10^{-5} M.

Los estudios de estructura-función para sNPF habían sido reportados previamente. Para el péptido Lepde-NPF-I (ARGPQLRLRFa) se demostró que el reemplazo de la Arg en las posiciones dos, siete o nueve con un His resulta en la pérdida de la potencia cardioinhibidora del péptido en *T. molitor*. Otros estudios demuestran que la amidación C-terminal y los residuos Arg2, Pro4, Arg7 y Arg9 son necesarios para preservar la actividad inhibidora del péptido en corazón (Czarnowski *et al.*, 2016).

Aquí observamos que la actividad de los péptidos análogos es mioinhibitoria, a pesar de las modificaciones en la secuencia aminoacídica. Esto sugiere que el sitio activo del péptido está en la región C- terminal, lo cual concuerda con que ésta es la región conservada a lo largo de la filogenia de los insectos (Nichols, 2006; Leander *et al.*, 2015). Estos resultados son relevantes al momento de corroborar la relación estructura función del neuropéptido y clave en la búsqueda de nuevos blancos peptídicos.

La identificación y caracterización de un péptido cardiorregulador es un enfoque atractivo para el descubrimiento de nuevos sitios blanco para insecticidas. El diseño de un antagonista de unión de un ligando peptidérgico a un GPCR es una vía promisorio en el descubrimiento de nuevas moléculas para el desarrollo de compuestos químicos como estrategia para el control de insectos plaga.

Los péptidos fisiológicamente activos a menudo se pueden agrupar basándose en un motivo común y, con frecuencia, existen estructuras ortólogas funcionalmente similares en vertebrados e invertebrados. Los miembros de una familia de péptidos cardiorreguladores están relacionados por una región C-terminal idéntica RF-NH₂. El primer péptido identificado con este motivo fue el tetrapéptido cardioactivo FMRF-NH₂ (Price e Greenberg, 1977) Posteriormente, se identificaron numerosos péptidos

cardioregulatorios relacionados con FMRF-NH₂ (FaRP) que incluyen el péptido-1 relacionado con RFamida (RFRP-1) en mamíferos (Nichols *et al.*, 1988). La familia FaRP se puede dividir en grupos según XRF-NH₂, donde X define la subfamilia. El péptido maduro de *Rhoprs*NPF es un endecapéptido de esta familia de secuencia **NNRSPQLRLRF-NH₂**, que interactúa con un GPCR (Ons, 2017). En colaboración con la Dra. Ruthann Nichols (Biological Chemistry Department, University of Michigan Medical School), se realizaron predicciones de interacción ligando-receptor para este péptido. A fin de evaluar dichas predicciones se diseñaron análogos peptídicos truncados en la región amino terminal (**Figura 3.4.9**). Los estudios de relación estructura-función (SAR de su sigla en inglés: *Structure-activity relationships*) son clave en la investigación para mejorar las propiedades biológicas de los péptidos nativos en favor de encontrar moléculas con mayor estabilidad, efectividad, etc. Los estudios de SAR implican la modificación sistemática de un péptido para proporcionar una idea de los determinantes moleculares de las interacciones ligando-receptor, que dan como resultado la estimulación o inhibición del receptor (Singh *et al.*, 2010). En conjunto, los resultados descritos en el presente Capítulo aportaron información novedosa que colabora en la caracterización funcional del neuropeptidoma de *R. prolixus*.

4. Discusión General

4. Discusión General.

El manejo integrado de vectores (MIV) se plantea como un proceso decisorio para el manejo de poblaciones de insectos de importancia sanitaria, con el objetivo de reducir o interrumpir la transmisión vectorial de agentes patógenos (WHO, 2012). Se trata de un abordaje que tiene en cuenta la infraestructura y los recursos sanitarios disponibles e integra todas herramientas químicas, biológicas y/o ambientales (www.paho.org).

En nuestro grupo de trabajo hemos reportado la existencia de dos mutaciones en el canal de sodio dependiente de voltaje, sitio de acción de los piretroides: L1014F, en una población de Salta, cercana a la frontera boliviana (Fabro *et al.*, 2012) y L925I en una población del centro del Chaco argentino (Capriotti *et al.*, 2014). Para ambas mutaciones hemos desarrollado ensayos moleculares para detectar su presencia en el campo (Fabro *et al.*, 2012; Capriotti *et al.*, 2014). Un aporte significativo de esta Tesis Doctoral fue el relevamiento de la presencia de la mutación L925I en poblaciones de *T. infestans* del área del Gran Chaco. Gracias al ensayo REA (Capítulo 1), se pudo determinar la presencia de esta mutación de forma muy localizada en poblaciones de la Provincia de Chaco, Argentina: El Juramento, La Esperanza, La Geronima y El Malá (previamente reportada en Capriotti *et al.*, 2014). En el mismo sentido, en un trabajo en paralelo, se evaluó la presencia de la mutación L1014F y se reportó su presencia en poblaciones de la frontera argentino-boliviana: Yacuiba, Villa del Carmen, Tierras Nuevas y Madrejones. Para ninguna de las poblaciones estudiadas hemos detectado la presencia de las dos mutaciones en conjunto (Sierra y Capriotti., 2016) Esto es interesante y permite hipotetizar que el surgimiento de estas mutaciones ocurrió de forma independiente y que existen dos focos de resistencia: Argentino-Boliviana y Provincia de Chaco, caracterizadas por la presencia de diferentes SNP: L1014F y L925I, respectivamente (Sierra y Capriotti., 2016). Si bien existen otros mecanismos de resistencia contributivos (Germano *et al.*, 2012; Fronza *et al.*, 2016; Grosso *et al.*, 2016; Calderón-Fernández *et al.*, 2017; Traverso *et al.*, 2017) consideramos que en el área del Gran Chaco la presencia de estas mutaciones en el canal de sodio son la principal causa de la resistencia a piretroides asocias a las fallas en el control de triatomos.

Para superar el problema de resistencia, se recomienda la implementación de estrategias de monitoreo (WHO, 2012). Si bien existen métodos toxicológicos, los métodos moleculares dan la ventaja de permitir una detección antes de que la resistencia se haya generalizado e instalado en una población. El ensayo molecular REA validado

esta Tesis es una herramienta útil para la detección temprana de la mutación L925I en el campo. En base a esto hicimos una estimación de ocurrencia de la mutación L925I en poblaciones del Gran Chaco, la cual sugirió que esta mutación se ha fijado o está próxima a hacerlo en las poblaciones de La Esperanza, La Geronima, El Juramento y El Malá (Capriotti *et al.*, 2014; Sierra y Capriotti, 2016).

Otra de las pautas que pone de manifiesto la Organización Mundial de la Salud, a tener en cuenta para el manejo integrado de vectores, es que resulta urgente identificar insecticidas con distintos modos de acción, que permitan diversificar y ampliar las herramientas disponibles para el control de artrópodos de importancia sanitaria (WHO, 2012; Dias y Moraes, 2014). Se busca que estos compuestos sean eficientes a dosis bajas, amigables con el medio ambiente, sostenibles, costo-efectivos y seguros para mamíferos. Numerosos estudios proponen a los neuropéptidos y sus receptores como posibles blancos neuroendocrinos, plausibles de ser usados en el desarrollo de nuevos insecticidas (Gäde *et al.*, 2003; Scherkenback *et al.*, 2009; Verlinden *et al.*, 2014; Audsley *et al.*, 2015). Sin embargo, el papel biológico de muchos de ellos no ha sido descrito, y es actualmente objeto de numerosas investigaciones en todo el mundo. En esta Tesis Doctoral nos planteamos investigar aspectos de la regulación neuroendócrina de triatominos, particularmente el proceso de diuresis, con aplicabilidad en la identificación de posibles blancos de insecticidas de nueva generación. La diuresis de los triatominos es un blanco interesante; su interrupción no sólo afectaría la fisiología normal del insecto, sino que también podría interferir con la evacuación de heces conteniendo al parásito *T. cruzi* sobre el hospedador.

En esta Tesis se evaluó la función diurética de un número considerable de neuropéptidos solos y en conjunto con 5-HT; puesto que los péptidos diuréticos o anti diuréticos identificados hasta ahora en *R. prolixus* actúan en sinergismo con 5-HT. Como era esperable, el *screening* realizado arrojó resultados negativos para la mayoría de los neuropéptidos evaluados. Sin embargo, uno de ellos (CCHamida) sí reveló un efecto diurético significativo y reproducible sobre los túbulos de Malpighi en conjunción con 5-HT. En el transcurso de esta Tesis Doctoral, se realizaron los primeros estudios funcionales que establecen la implicancia de CCHamida en la regulación de la diuresis postprandial de *R. prolixus*.

El silenciamiento de genes por ARNi se ha constituido como una técnica fiable y con buenos resultados en el estudio de genes en triatominos (por ejemplo, Araujo *et al.*, 2006, Lavore *et al.*, 2012, Wulff *et al.*, 2017). A través del silenciamiento del gen por

ARNi hemos conseguido determinar un efecto dual de *RhoprCCHa*, al actuar inhibiendo la diuresis inmediata, y estimulándola hacia el final del proceso. Estos resultados fueron confirmados con ensayos *in vitro*, donde observamos una inhibición de la absorción por parte del intestino medio anterior y una estimulación de la excreción por parte de los túbulos de Malpighi. En vista de la relevancia de los resultados obtenidos, se prevé continuar la caracterización molecular y fisiológica de CCHamida. En este sentido, se propone la hipótesis de que el neuropéptido CCHamida se encuentra implicado en procesos de excreción de productos del metabolismo derivados de la ingesta de sangre, ejerciendo una función opuesta en los túbulos de Malpighi e intestino anterior.

El proceso diurético requiere el control integrado del intestino anterior y los túbulos de Malpighi, lo que permite generar altas tasas de producción de orina, y al mismo tiempo regular el volumen y composición de la hemolinfa (Ianowski *et al.* 2010). Planteamos que este tipo de regulación sería crucial en los insectos durante la digestión que ocurre en los días posteriores a la ingesta, momento en el cual el mantenimiento de la homeostasis requiere la conservación de agua, al mismo tiempo que la excreción de metabolitos tóxicos derivados de la digestión de la sangre. Es interesante destacar que *RhoprCCHa* es el primer neuropéptido estudiado, hasta nuestro conocimiento, en presentar distintos efectos (diurético vs. anti diurético) en distintas estructuras. El resto de las moléculas estudiadas presentaron o bien un efecto netamente diurético (CRF-like DH) o anti diurético tanto en túbulos de Malpighi como en intestino medio anterior (Te Brugge *et al.*, 2005; Orchard e Paluzzi, 2009; Te Brugge *et al.*, 2009; Ianowski *et al.*, 2010; Zandawala *et al.*, 2013; Paluzzi *et al.*, 2015). La presencia de un neuropéptido con actividad dual permitiría una regulación más fina del proceso, dependiente del tiempo y las condiciones fisiológicas.

Muchos de los neuropéptidos identificados hasta hoy en insectos tienen un papel estimulador o inhibidor de la contracción muscular; asociado posiblemente a su función principal: procesos relacionados a la diuresis, ecdisis, alimentación, etc (Nassel, 2002). En *RhoprOKs*, esta función permanecía sin ser estudiada hasta la presente Tesis Doctoral. Nuestros resultados dan cuenta de un efecto miotrópico de *RhoprOKB* en aorta e intestino anterior. Posiblemente relacionado a su rol regulador de la ecdisis, recientemente reportado por nuestro grupo de trabajo (Wulff *et al.*, 2017).

En el estudio de *RhoprsNPF*, un péptido con función miotrópica reportada en otros insectos (Czarnowski *et al.*, 2016); pudimos determinar que el péptido ejerce una inhibición dosis dependiente de la frecuencia cardíaca en aorta y de las ondas peristálticas

en intestino. Además, evaluamos dos análogos peptídicos, truncados en la región N-terminal; los cuales mantuvieron la inhibición. Esto es muy importante en el desarrollo de análogos peptídicos donde se requiere de un conocimiento profundo de la fisiología del insecto y la caracterización de los mecanismos de interacción ligando-receptor.

En conjunto, en el presente trabajo se analizó un aspecto de la resistencia a insecticidas por parte de poblaciones naturales de *T. infestans* (distribución, frecuencia y detección de la mutación *kdr* L925I). En el contexto de fallas en el control de triatomíneos, debidas en parte a poblaciones de altísima resistencia, se avanzó en estudios de regulación endocrina. Se caracterizaron nuevas funciones para neuropéptidos poco estudiados. En particular, se reporta por primera vez la función de uno de ellos en la regulación de los procesos de diuresis y anti diuresis. Por lo anterior, los trabajos presentan relevancia en el campo de la entomología básica y aplicada, y abrieron nuevas direcciones de investigación en nuestro grupo de trabajo.

5. Conclusiones

5. Conclusiones

Durante el desarrollo de esta Tesis se abordaron dos temáticas: la problemática de la resistencia a insecticidas piretroides en *T. infestans* y el estudio de la fisiología del triatomino *R. prolixus*. De los resultados concluimos que:

- *La mutación L925I está presente en todas las poblaciones de alta resistencia de la Provincia argentina de Chaco. Los resultados sugieren que esta mutación se ha fijado en estas poblaciones, o bien se encuentra presente en una proporción muy alta de individuos.*
- *El ensayo REA es una herramienta útil para la detección de la mutación L925I a campo y su utilización permitiría el hallazgo y detección temprana de la mutación en otras poblaciones.*
- *Se realizó un screening de neuropéptidos evaluando el efecto en la excreción por parte de túbulos de Malpighi de *R. prolixus* mediante el ensayo de Ramsay. Se encontró actividad en la estimulación de la excreción por parte de CCHamida, lo que sugiere un papel en la regulación de la diuresis.*
- *CCHamida, ejerce una función dual y opuesta en túbulos de Malpighi e intestino medio anterior. Además, se determinó la expresión del neuropéptido y sus receptores tejidos relacionados con la regulación de la diuresis.*
- *Las Orcoquininas son estimuladoras de la contracción de la aorta, actuando en sinergismo OKA y OKB. También, encontramos que OKB actúa como estimulador de las ondas peristálticas en el intestino anterior del insecto.*
- *El neuropéptido sNPF actúa como inhibidor de la frecuencia cardiaca en aorta y de las ondas peristálticas en intestino medio. En el estudio de dos análogos peptídicos truncados en la región amino terminal de sNPF encontramos que ambos péptidos ejercen este rol mioinhibidor; por lo que la estructura C- terminal del péptido es fundamental para la interacción con el receptor.*

- *Los resultados presentados aquí son de interés dentro del área del control de insectos plaga y en el manejo de la resistencia. Los aportes en el área de la fisiología de los triatominos sientan las bases para investigaciones futuras. El conocimiento de la estructura y función del neuropeptidoma es una herramienta para el desarrollo de insecticidas con distintos modos de acción, a fin de suplantarlo o minimizar el uso de insecticidas neurotóxicos de alto impacto ambiental.*

6. Materiales y Métodos

6.1 Insectos.

Los insectos pertenecientes a la cepa de laboratorio de *T. infestans* fueron provistos por el Servicio Nacional de Chagas (Valle de Punilla, Córdoba). Fueron criados bajo condiciones controladas de temperatura ($28 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad (50-70%) y fotoperíodo (12:12 L: O). La alimentación se efectuó sobre aves (palomas o gallinas). Los insectos mantenidos en el laboratorio nunca fueron expuestos a ningún tipo de insecticida ni otros tóxicos. Como poblaciones resistentes se utilizaron insectos provenientes de las localidades de Madrejones (M) ($22^\circ 02' \text{ S}$, $63^\circ 37' \text{ W}$) (Salta), La Esperanza (LE) ($26^\circ 03' \text{ S}$, $60^\circ 27' \text{ W}$) (Chaco), La Gerónima (LG) ($26^\circ 04' \text{ S}$, $60^\circ 16' \text{ W}$) (Chaco), El Juramento (EJ) ($25^\circ 54' \text{ S}$, $60^\circ 24' \text{ W}$) (Chaco), El Malá (EM) ($25^\circ 56' \text{ S}$, $60^\circ 27' \text{ W}$) (Chaco), Pampa Grande (PG) ($27^\circ 06' \text{ S}$, $60^\circ 59' \text{ W}$) (Chaco), y las localidades bolivianas de Tierras Nuevas (TN) ($21^\circ 44' \text{ S}$, $63^\circ 33' \text{ W}$) (Departamento Santa Cruz), Villa El Carmen (VC) ($21^\circ 47' \text{ S}$, $63^\circ 34' \text{ W}$) (Departamento Santa Cruz), and Yacuiba (Y) ($22^\circ 01' \text{ S}$, $63^\circ 40' \text{ W}$) (Departamento Tarija) (**Figura 6.1**).

Los insectos de la especie *R. prolixus* fueron obtenidos de una colonia establecida en nuestro laboratorio, originarios de una colonia mantenida en el Servicio Nacional de Chagas, Córdoba, mantenidos a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y 45% de humedad relativa, con un ciclo de 12:12 horas de luz: oscuridad. La alimentación se realizó sobre gallinas que son mantenidas de acuerdo con la resolución 1047/2005 (Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica, CONICET) de acuerdo con el Marco Ético de Referencia para las Investigaciones Biomédicas en Animales de Laboratorio, de Granja y Obtenidos de la Naturaleza. Las consideraciones de bioseguridad están de acuerdo con la resolución 1619/2008 del CONICET, en concordancia con el Manual de Bioseguridad de la OMS (ISBN 92 4354 6503).



Figura 6.1: Mapa con la localización de las poblaciones de *T. infestans* estudiadas. Sierra y Capriotti., 2016.

6.2 Técnicas de Biología Molecular.

6.2.1 Extracción de ADN genómico

Se realizó la extracción de ADN genómico con el kit Wizard® *Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, Wisconsin) según las indicaciones del fabricante. Se extrajo el tejido de *T. infestans* en estadio de ninfa 3°, 4° o 5°, y se colocó en tubos tipo *ependorf* con 600 µl de solución de lisis nuclear. Se homogeneizó el tejido con un embolo de plástico durante 10 seg. y luego, se incubó a 65 °C por 30 min. Se agregaron 3 µl de la solución de ARNasa, se mezcló y se incubó durante 30 min. a 37° C. Posteriormente, se agregaron 200 µl de la solución de precipitación de proteínas, se agitó fuertemente la mezcla con un *vortex* y se incubó a 4 °C durante 5 min. Se centrifugó a 13000 rpm por 4 min, se transfirió el sobrenadante a otro tubo tipo *ependorf* que contenía 600 µl de isopropanol y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 13000 rpm por 1 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se lavó con 600 µl de etanol 70%, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min. Se descartó el etanol y se dejó secar el precipitado en estufa a 37 °C hasta evaporación completa. El precipitado se resuspendió en 30 µl de agua autoclavada calidad *MilliQ*. Para comprobar la calidad

del ADN genómico obtenido y su concentración, se sembró 1 µl de cada muestra en un gel de agarosa 1% tinción BrEt (ver apartado “Electroforesis en geles de agarosa”).

6.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa

Para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo los siguientes protocolos según el caso:

Fragmentos de hasta 1500 pb: se utilizó la enzima Taq polimerasa (PB-L, Quilmes, Argentina). Las mezclas de reacción se prepararon con 2,5 U de enzima Taq en el buffer de reacción correspondiente con una concentración de 500 µM de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µM de cada oligonucleótido (*forward* y *reverse*), 1,25 mM de MgCl₂ y 50 ng de ADNc de *R. prolixus*, o 25 ng de ADN genómico de *T. infestans* según el caso, en un volumen final de reacción de 10 µl. El programa general de ciclado utilizado consistió en un primer paso de desnaturalización del ADN (5 min a 94 °C), 30-45 ciclos con los pasos de desnaturalización (30 seg a 94 °C), hibridación (60 seg a la temperatura de hibridación de los *primers*; entre 50 y 65 °C), extensión (aproximadamente 1 min por cada 1000 pares de bases (bp) a 72 °C) y un paso de extensión final de 10 min a 72 °C.

Productos mayores a 1500 pb: se utilizó la enzima de alta fidelidad Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California. USA). Las reacciones de amplificación se realizaron con 1 U de enzima en el *buffer* de reacción correspondiente (BSA 1mg/ml, MgSO₄ 1,2 mM) con una concentración de 500 µM de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 Mm de cada *primer*, 625 µM de MgCl₂ y 25 ng de ADN genómico de *T. infestans* o 50 ng de ADNc de *R. prolixus*, en un volumen final de reacción de 10 µl. El programa general de ciclado utilizado consistió en un primer paso de desnaturalización del ADN (5 min a 94° C), 30 ciclos con los pasos de desnaturalización (30 seg a 94° C), hibridación (60 seg a la temperatura de hibridación de los *primers*), extensión (aproximadamente 1 min por cada 1000 pb a 68° C) y un paso final de extensión de 10 min a 68° C.

En la **Tabla 8. 1** de Anexos se lista el nombre y secuencia de todos los *primers* utilizados durante el desarrollo del presente trabajo, y la temperatura de hibridación para cada uno de ellos.

En la **Figura 6.2** se muestran la posición de los *primers* usados para la amplificación de los fragmentos del gen TiNa_v de *T. infestans*.

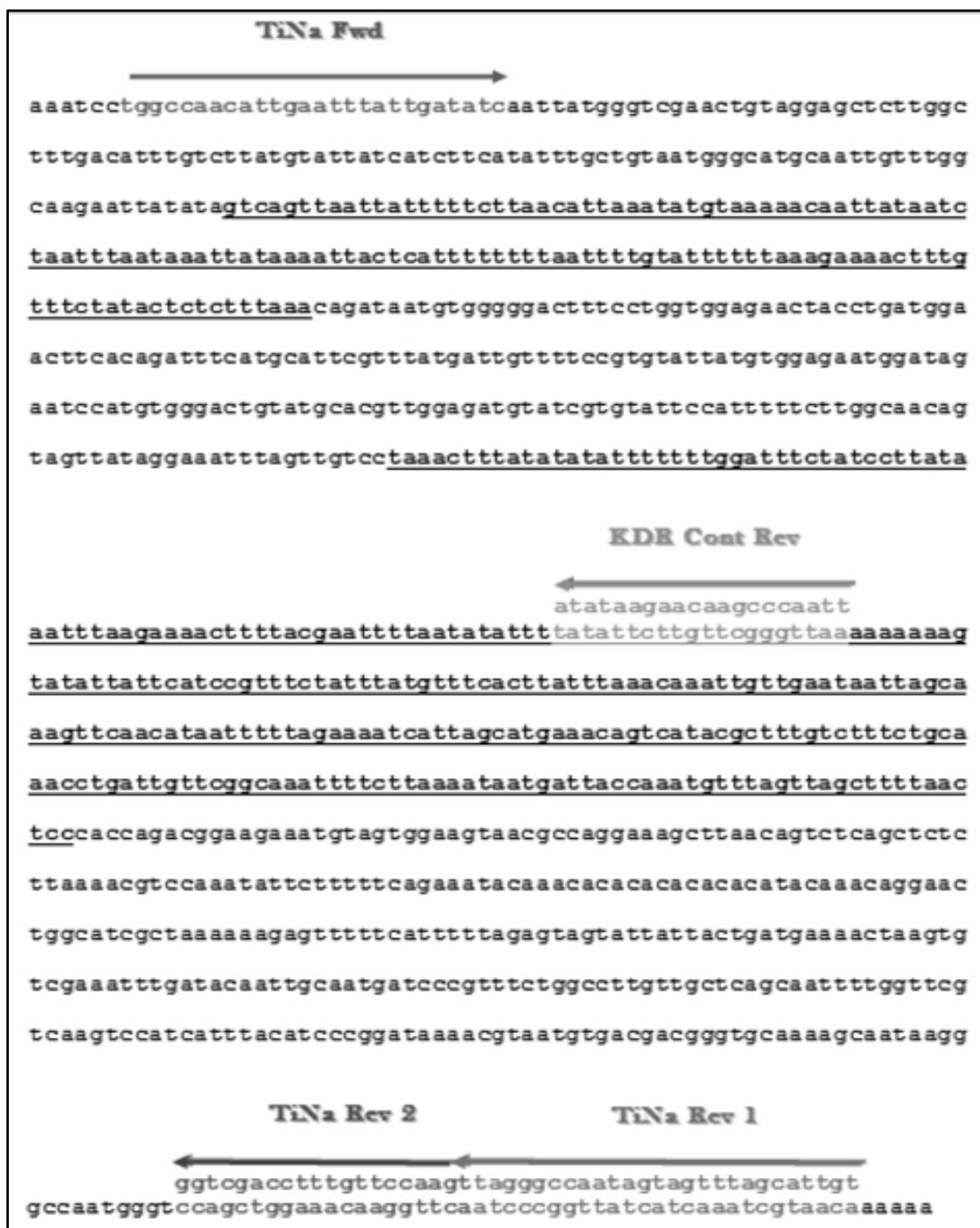


Figura 6.2: Secuencia nucleotídica del dominio II del canal de sodio dependiente de voltaje de *T. infestans*, y posición de los *primers* utilizados en las reacciones de PCR. En subrayado se muestran las regiones intrónicas de la secuencia.

6.2.3 Electroforesis en geles de agarosa

Se disolvió completamente la agarosa de baja electroendosmosis (Promega, Madison, USA) (1, 1,5 o 2 % según el tamaño de amplicón esperado) en buffer TBE (ver “Soluciones” en Anexos), calentado en horno microondas. Se agregaron 3 µl Bromuro de etidio (BrEt) por cada 100 ml de solución de agarosa. Los geles se armaron sobre soportes de acrílico. Una vez polimerizados se colocaron en la cuba de electroforesis y cubrieron con *buffer* TBE. Por cada 10 µl de solución de ADN se agregaron 3 µl de *buffer* de siembra (ver “Soluciones” en Anexos) o formamida (Merck, Darmstadt, Alemania). Las muestras fueron corridas en paralelo junto a un marcador de peso molecular de 100 pb (Productos Bio-lógicos, Quilmes, Argentina).

Las corridas electroforéticas se realizaron a 90 V durante 45 min. aproximadamente. Se visualizaron los geles en un transiluminador de luz UV de 310 nm (Syngene, Cambridge, USA) hizo la captura de la imagen con una cámara fotográfica marca Cannon. La cantidad de ADN fue cuantificada a partir de las imágenes de los geles mediante el programa informático *Image J* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

6.2.4 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

La purificación de bandas de geles de agarosa se realizó con el *kit* Qiagen II (Qiagen Inc, Hiden, Alemania) o el *kit* PURO I AGAROSA (PB-L, Quilmes, Argentina) según indicaciones de cada fabricante. Se cortó la porción del gel que contenía al ADN de interés con un bisturí estéril y se introdujo en un tubo tipo *eppendorf* de 1,5 ml. Por cada 100 mg de gel de agarosa se agregaron 300 µl de *Buffer* A de resuspensión y se incubó a 55 ° C, hasta no visualizar restos de gel; cada 2 o 3 min. se vortexeo la muestra para optimizar la disolución. Se preparó una columna de unión de ADN en un tubo colector de 2 ml y se cargó la solución obtenida. Se centrifugó durante 1 min. a 13000 rpm y se desechó el filtrado colectado. Se efectuó un lavado adicionando 750 µl de *Buffer* B en la columna y se centrifugó durante 2 min. a 13000 rpm. Para la elución se colocó la columna en un tubo tipo *eppendorf* de 1, 5 ml estéril y se agregaron 25 µl de agua tipo *MilliQ* directamente sobre la membrana de la columna. Se incubó 1 min. a temperatura ambiente y se centrifugó 1 min. a 13000 rpm. Se colectó el producto de elución que

contenía el ADN purificado. Para comprobar la calidad y cantidad del producto obtenido se sembraron 0,3 µl de muestra en un gel de agarosa 1 o 2 %, tinción BrEt.

6.2.5 Ligación de Fragmentos

Se utilizó el vector de clonado *pGEM-T easy* (Promega, Madison, USA). Se subclonó un fragmento de alrededor de 572 pb (producto de reacción de PCR) con una relación vector: inserto 1: 1 (radio molar). En la **Tabla 6.1** se detalla la mezcla de utilizada en la reacción de ligación realizada a 4° C durante 12 hs.

Componente de reacción	Volumen (µl)
Buffer de ligación Rapid Ligation 2X, T4 DNA Ligase	2,4
Vector pGEM-T easy vector (50ng)	0,5
Producto de PCR	6,1
Ligasa T4 ADN (3 U/µl)	0,5
H ₂ O Mili Q	1,5
Volumen final	10

Tabla 6.1: Mix de Ligación

6.2.6 Transformación en bacterias competentes

Se transformaron 50 µl de bacterias competentes químicas preparadas según el método de Inoue, et al. 1990, con la mitad de la mezcla de reacción de ligación, o 50 ng de plásmido purificado. Se incubó en hielo por 30 min, luego se pasó por 30 seg. a 42° C y 3 min finales en hielo. Se agregaron 900 µl de medio LB estéril (ver “Soluciones”) y se mantuvo en agitación durante 1 h a 37 °C. De 100 a 150 µl del cultivo fueron sembrados en placas de Petri con medio LB agar (ver “Soluciones” en Anexos) con ampicilina (50µg/ml), 100 µl IPTG (0,1 M), 50 µl X-Gal (50 ng/ml) y se incubó toda la noche a una temperatura de 37 °C. El *Multiple Cloning Site* (MCS) del vector pGEM-T interrumpe una región codificante para el péptido-α de la enzima β-galactosidasa, la cual cliva el

sustrato X-gal generando un producto color azul. Por lo tanto, adicionando el inductor de expresión IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) y el sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) pueden ser reconocidos los recombinantes, en los cuales el inserto habrá interrumpido la secuencia de la β -galactosidasa, a partir del método de diferenciación de colonias blancas/azules en placa de LB. Las colonias blancas fueron tomadas con un *tip* estéril y trasladadas a tubos de ensayo estériles con 5 ml de medio LB con ampicilina. El cultivo bacteriano se dejó creciendo toda la noche en estufa a 37°C con agitación (200 rpm).

6.2.7 Purificación de ADN plasmídico.

Para la purificación de ADN plasmídico se utilizó el *kit* comercial *UltraClean® Standard Mini Plasmid Prep Kit Sample* (Mo Bio; Carlsbad, USA) según las instrucciones del fabricante. Se colocaron 2 ml de medio LB saturado con la suspensión de bacterias en un tubo tipo *ependorf* y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min. Se descartó el sobrenadante, se agregaron 100 μ l de la Solución 1 y se vortexó la muestra, a fin de resuspender el precipitado y promover la lisis celular. Se agregaron 200 μ l de Solución 2 a la suspensión y se invirtió el tubo 8 veces. Se agregaron 400 μ l de Solución 3 y se centrifugó durante 3 min. a 13000 rpm. Se obtuvo un sobrenadante claro no viscoso que fue transferido a un *Spin Filter* preparado en un tubo de 2 ml, evitando contaminaciones con el precipitado. Se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min, lo que permitió que el líquido fluyera a través de la membrana y el ADN quedara unido a la membrana del filtro. Se agregaron 600 μ l de la Solución 4 al *Spin Filter* y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min., a fin de lavar el ADN plasmídico. Se agregaron 50 μ l de Solución 5 al *Spin Filter* para la elución del ADN plasmídico. Se corroboró la presencia del inserto de interés mediante PCR con *primers* específicos.

6.2.8 Secuenciación de fragmentos

Las muestras que contenían el inserto del tamaño deseado o productos de PCR fueron pirosecuenciadas en el servicio comercial de la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Los *primers* indicados para realizar la secuenciación de las muestras fueron los del promotor T7. Para la secuenciación directa de productos de PCR los

primers utilizados fueron *CCH-aRNAiRproRev* y *CCH-aRNAiRproFwd* (ver secuencias en la Tabla 8.1 de Anexos).

6.2.9 Alineamiento de secuencias y análisis de la variabilidad en sitios puntuales

El alineamiento múltiple de secuencias se realizó con el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

6.2.10 Validación del ensayo para la detección de la mutación L925I en poblaciones de Gran Chaco

Ensayo de digestión:

Se realizó la digestión del ADN de las muestras por separado, con la siguiente mezcla de reacción:

Componente de reacción	Volumen (µl)
Buffer Tango Yellow (10 X)	2
ADN molde (1 µg)	10
Sac I (5U/µL)	1
H ₂ O Mili Q	7
Volumen final	20

Tabla 6.2: Mix Digestión con Sac I.

La enzima Sac I (FD1134) utilizada fue de la marca Fermentas (Massachusetts, USA) El sitio de reconocimiento se muestra a continuación:



Visualización de los productos de digestión:

Se preparó un gel de agarosa 2,5 % y se sembraron 20 µl de cada una de las muestras con 3 µl de *buffer* de siembra, en paralelo al marcador de peso molecular (Productos Bio-lógicos, Quilmes, Argentina). La corrida electroforética se realizó con buffer TBE 1X a 90 voltios durante 1 hora. Los geles fueron teñidos con Sybr Gold (Molecular Probes, Invitrogen, San Pablo, Brasil). Se colocó el gel en un recipiente opaco y se cubrió con la solución de tinción (1:10 Sybr gold en TBE 1X). Se mantuvo en agitación por 40 min. y luego se visualizó y documentó el gel en un transiluminador UV asociado a cámara Cannon. En la **Figura 6.3** se muestra una imagen a modo de ejemplo.

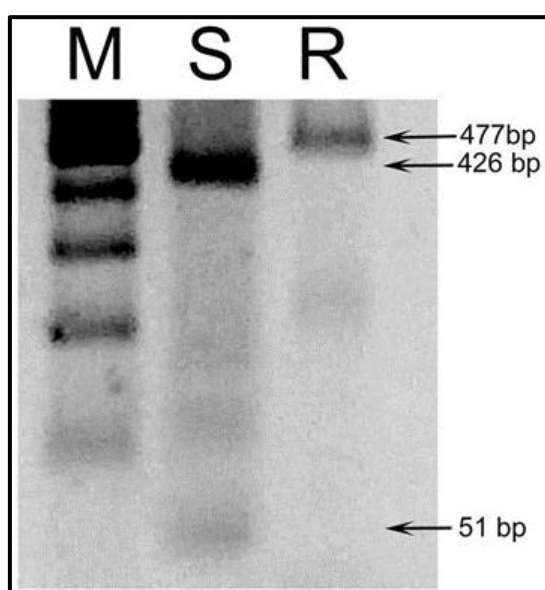


Figura 6.3: Ensayo REA y detección de la mutación L925I con la endonucleasa de restricción Sac I. M: marcador de peso molecular. Muestra S de población sensible, sin digerir. Muestra R de población resistente, digerida. (Capriotti et al., 2014)

6.2.11 Sensibilidad del ensayo restriction endonuclease assay (REA)

Se preparó ADN genómico de cada una de las poblaciones según lo detallado previamente (ver apartado 6.2.1). La zona del dominio II del gen *TiNa_v* fue amplificada mediante PCR tipo *heminested*. Para la primer PCR se utilizaron los *primers* Tina Fwd y Tina Rev1 (ver secuencias en tabla 8.1 de Anexos) y los siguientes parámetros: 20 ng de DNA, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, 1.5mM MgCl₂, 1U Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil) y se corrieron 30 ciclos con 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, y 4 min a 72 °C. Un µl de esta reacción fue utilizado como molde para la

segunda PCR con los *primers* Tina Fwd y Tina Rev2 (Ver secuencia en tabla 8. 1 de Anexos) con los parámetros: 0,2 mM dNTP, 0,2 µM de cada primer, 1.5mM MgCl₂, 1U Taq Takara DNA Polymerase. Se realizaron 30 ciclos con 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, y 6 min a 65 °C. Por último, utilizando 1µl de la segunda PCR, se amplificó el fragmento por medio de los *primers* Tina Fwd y y Kdr Cont Rev con los siguientes parámetros: 0.2 mM dNTP, 0.2 µM de cada primer, 1.5mM MgCl₂, 1U Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil). Se realizaron 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 50 s a 52 °C, y 52 s a 72 °C. El fragmento se aisló del gel de agarosa utilizando el kit y protocolo antes mencionado (ver apartado 6.2.4). El fragmento amplificado fue clonado utilizando 50 ng del vector pGEM-T Easy Vector y 28,56 ng de inserto (ver apartado 6.2.5). Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5- α según el protocolo antes mencionado (ver apartado 6.2.6). Las bacterias transformadas se sembraron en placas con LB Ampicilina 50µg/ml. Se sembraron en placa 100 µl de bacterias transformadas, 100 µl IPTG 0,1 M y 50 µl de X - Gal 50 ng/ml. Se incubó durante 24 hs a 37 °C y se seleccionaron las colonias blancas (con inserto). Se aisló el plásmido utilizando el *kit* comercial y protocolo antes mencionado (ver apartado 6.2.7). Se corroboró la presencia del inserto mediante PCR con los *primers* específicos Tina Fwd y y Kdr Cont Rev y según los parámetros de ciclado arriba mencionados. El ADN plasmídico se llevó a una concentración final de 15 ng/µl. Para cada población (sensible y resistente) se seleccionó un clon y el ADN plasmídico se combinó en las siguientes relaciones molares: 0:10; 0,25: 9,75; 0,5; 9,5; 1: 9; 2: 8, 3: 7, 5: 5 y 10: 0 (siendo esto: mutación L925I asociada a resistencia: SNP salvaje). Se aplicó el ensayo REA para cada una de las mezclas a fin de validar su sensibilidad (ver apartado 6.2.11).

6.2.12 Disección de tejidos y extracción de ARN

Las microdisecciones fueron realizadas bajo lupa estereoscópica (Zeiss, Oberkochen, Alemania) a partir de *R. prolixus* en estadio de ninfa quinta. Las muestras fueron mantenidas en TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) y congeladas a -80 °C, para su posterior procesamiento. Se colocaron tejidos provenientes de tres insectos en 200 µl de Trizol ® (Invitrogen) y se procedió a la homogeneización mediante *vortex* y machacado con émbolo de los tejidos congelados. Se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente; se agregaron 40 µl de cloroformo a cada muestra y se agitó por 15 seg. con *vortex*. Se centrifugó durante 15 min. a 12000 rpm y posteriormente se procedió a

recuperar la fase acuosa. Se agregaron 100 μ l de isopropanol y se incubó por 10 min. a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado con 250 μ l de etanol 75%, centrifugación 7500 rpm por 5 min. El precipitado fue secado al aire durante 5 min. y luego resuspendido en 20 μ l de agua con DEPC. La calidad y concentración del ARN extraído fueron comprobadas mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% según lo detallado más arriba. En la **Figura 6.4** se muestra el ARN extraído de una muestra de tejido blando a modo de ejemplo.

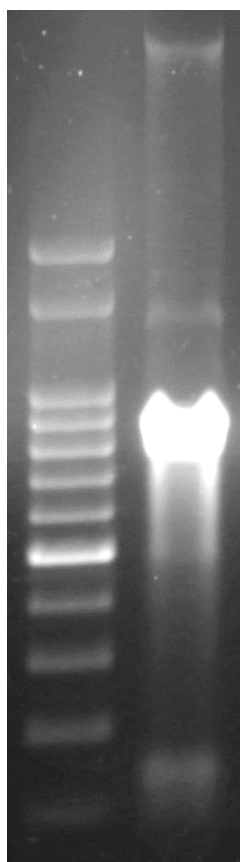


Figura 6.4: Muestra de ARN extraída de tejido blando ninfas V estadio. Gel de agarosa 1%, tinción Br Et.

6.2.13 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

El producto obtenido de la extracción de ARN y tratado con ADNasa fue utilizado para la síntesis de ADNc con la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Wisconsin, USA). Para esto se adiciono 1 μ l de EDTA 50 mM a la muestra de ARN, se incubó durante 10 min. a 65 °C y se le agregó 1 μ l de oligo DT 100 μ M. Se incubó durante 5 min. a 70 °C y se puso inmediatamente en un baño helado por 5 min. Posteriormente,

se le adiciono la mezcla de reacción de la enzima (ver **Tabla 6.3**) y se incubó por 2 min. a 37 °C. Luego, se le agregó 1 µl de la enzima M-MLV. Para la extensión se incubó la mezcla de reacción durante 2 hs a 42 °C. La inactivación de la reacción se efectuó a 85 °C durante 5 min y luego en hielo por 5 min adicionales. Se efectuó PCR con *primers* específicos de *Actina* (ver secuencia en la **Tabla 8.1** de Anexos) para comprobar la calidad de molde de ADNc obtenido. El resultado se analizó en gel de agarosa 1%.

Componente de reacción	Volumen (µl)
M-MLV 5X Reaction Buffer	5
RiboLock RNase Inhibitor 40 U/ul	0,5
10 mM dNTPs Mix	2,5
H ₂ O Mili Q	4,5
Volumen final	12,5

Tabla 6.3: Mix de reacción para la síntesis de ADNc.

6.2.14 Silenciamiento génico mediante la técnica de ARN de interferencia: síntesis de ARN doble cadena.

Se amplificó por PCR un fragmento de 230 pb del gen *RhoprCCHa*. Se utilizó como molde ADNc obtenido de tejido blando de ninfas quinto estadio de *R. prolixus*. Se diseñaron *primers* específicos (*CCHaRNAiFw* y *CCHaRNAiRev*; ver secuencias en la Tabla 8.1 de Anexos) conjugados en su extremo 5' con una secuencia de 23 nucleótidos del promotor T7 de la T7 ARN polimerasa. El producto de esta PCR se utilizó como molde de una segunda PCR con el *primer* T7 *full* (ver secuencia en la **Tabla 8.1** de Anexos), a fin de obtener mayor concentración del amplicón de interés. Ambos productos de PCR fueron enviados a secuenciar con el fin de corroborar la secuencia.

El producto de la segunda PCR se utilizó para obtener el ARN doble cadena, según el protocolo de la **Tabla 6.4**.

Componente de reacción	Volumen (μl)
5X Transcription buffer	10
ATP/GTP/CTP/UTP Mix, cada uno 10 mM	10 (2 mM concentración final)
ADN lineal	1 μg
T7 Polimerasa (ThermoFisher)	1.5 (30 u)
H ₂ O DEPC	hasta 50 μl
Volumen final	50μl

Tabla 6.4: Mix de Transcripción *in vitro*.

La reacción se realizó a 37 °C durante 8 a 12 hs. El producto de reacción de la retrotranscripción fue incubado dentro de un vaso de precipitados con H₂O a 95 °C durante 10 min. El vaso de precipitados (que contenía el tubo *eppendorf* con el ADNdc) fue mantenido a temperatura ambiente hasta que el H₂O se atemperó (3 a 4 hs). Posteriormente se realizó el tratamiento con ADNasa y ARNasa según se detalla en la **Tabla 6.5**.

Componente de reacción	Volumen (μl)
ARNdc	10μg
ADNasa I, libre de ARNasa (ThermoFisher)	2μl (2U)
ARNasa I (ThermoFisher)	0,5
Buffer de ARNasa I	5

Tabla 6.5: Mix de reacción para el tratamiento con ADNasa I y ARNasa I.

Las muestras fueron incubadas a 37° C durante 30 min. y posteriormente se realizó una extracción fenol: cloroformo: isoamilico y precipitación con Acetato de Sodio 3M, a fin de inactivar la ADNasa y ARNasa y concentrar la muestra de ARNdc. El precipitado se resuspendió en solución salina (ver preparación en Anexos).

6.2.15 Extracción fenol: cloroformo: isoamilico y precipitación con AcNa

Para las extracciones se agregó a la muestra un volumen de Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico en proporción 25: 24: 1, se mezcló con vortex y se centrifugó durante

5 min a T° ambiente. El sobrenadante fue colocado en otro tubo con 2,5 volúmenes de etanol frío y 0,1 volúmenes de Acetato de Sodio 3 M. Se dejó a -20 °C durante 8-12 hs. Posteriormente se centrifugó durante 20 min. a velocidad máxima. El precipitado fue lavado con etanol 70%, centrifugado durante 5 min. y finalmente resuspendido en agua con ARNasaA (0.5 µg/µl) (en el caso del ADN) o con DEPC (en caso de ARN).

6.2.16 Inyección de insectos para ARN de interferencia.

Los insectos en estadio de ninfa IV o V de *R. prolixus* fueron inyectados con una jeringa tipo Hamilton debajo de la tercera pata con 2µg/ 2µl de ARN doble cadena, o con solución salina (ver “Soluciones” en Anexos) para el grupo control.

6.2.17 Validación de la técnica de ARN de interferencia mediante PCR en Tiempo Real (qRT-PCR).

La eficiencia de los *primers* fue medida utilizando como molde diluciones puro, 1:2 y 1:4 del molde puro de ADNc proveniente de tejido blando de ninfas V estadio de *R. prolixus*. En la **Tabla 6.6** se muestra la mix de reacción utilizada:

Componente de reacción	Volumen (µl)
<i>FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Suiza)</i>	12,5
ADNc	2
<i>Primer CCH-aRpFwd</i>	0,5
<i>Primer CCH-aRpRev</i>	0,5
H ₂ O mili Q	9,5
Volumen final	25

Tabla 6.6: Mix de reacción para qRT-PCR

Se evaluó la eficiencia de los *primers* graficando el logaritmo en base 10 de las diluciones versus el promedio de los C_T para cada una de ellas. Del gráfico se obtuvo la ecuación de la recta que pasa por los tres puntos (con un valor de R^2 de 0.98) y se aplicó la ecuación:

$$\text{Amp efficiency} = 10^{(-1/\text{slope}) - 1} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Valores de eficiencia mayores a 85% o menores a 110% fueron tomados como parámetro para la validación de los *primers* para qRT-PCR.

Se eligió el molde puro para la medición de las muestras experimentales.

Como gen de referencia se utilizó el *housekeeping* Tubulina (*RhoprGADPH*) para determinar la eficiencia de silenciamiento. Los mismos fueron previamente validados y medida su eficiencia en Latorre-Estivalis *et al.* 2015.

Se realizaron amplificaciones por triplicado para el *housekeeping* y para el gen de interés (*RhoprCCHa*).

El programa de ciclado utilizado para la reacción de amplificación del *housekeeping* fue: (i) 95 ° C durante 5 min; (ii) 95 ° C durante 30 segundos; (iii) 60 ° C durante 30 segundos; (iv) los pasos (i) y (ii) fueron repetidos por 40 ciclos. Se incluyeron dos controles sin molde.

El programa de ciclado utilizado para la reacción de amplificación de *RhoprCCHa* fue: (i) 95 ° C durante 5 min; (ii) 95 ° C durante 30 segundos; (iii) 50 ° C durante 30 segundos; (iv) los pasos (i) y (ii) fueron repetidos por 40 ciclos. Se incluyeron dos controles sin molde.

6.3 Técnicas de Fisiología.

6.3.1 Ensayo de Ramsay.

Se utilizó la técnica de Ramsay modificada para medir la tasa de secreción en túbulos de Malpighi de ninfas de V estadio de *R. prolixus* (2 semanas post muda) (Madrell, 1980). Se procedió a la microdissección bajo lupa y con pinzas finas de los túbulos de Malpighi inmersos en solución salina (ver “Soluciones” en Anexos). Una vez separados del cuerpo, los túbulos fueron colocados en una gota de 90 µl de solución salina inmersa en un aceite mineral saturado de agua y montada en una placa de Petri con una

base siliconada de Sylgard ® 184 (Dow Corning, Michigan, USA). El extremo abierto del túbulo se extrajo de la gota de solución salina hacia el aceite mineral y se ató a un alfiler colocado a 2 mm de la gota. Posteriormente, se efectuó una incisión a fin de permitir la salida del fluido secretado. La placa de Petri se dividió en 2 según tratamiento: controles y tratados. En primer lugar, se estimularon los tubulos de Malpighi tratados con el neuropéptido seleccionado para el ensayo durante 40 min. Al no observarse secreción en ese lapso de tiempo mencionado se procedió a la estimulación con serotonina (5-HT, 5-Hidroxytriptamina) de los túbulos de Malpighi de ambos grupos. Cada una de las gotas de excreción fue retirada cada 10 min., posterior a la estimulación con 5-HT). Se tomó una foto de cada una de las gotas de excreción con la cámara MiniVid, LW Scientific, Lawrenceville, GA, USA y se midió su diámetro con el software *Image J 1.32* (NIH, USA). Se relativizó el diámetro a una regla de 1 mm. El volumen de cada gota de orina fue calculado con la siguiente ecuación:

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3 \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

En las **Figuras 6. 1** se esquematiza el ensayo de Ramsay y en la **Figura 6. 2** se muestra una foto tomada en uno de los experimentos realizados.

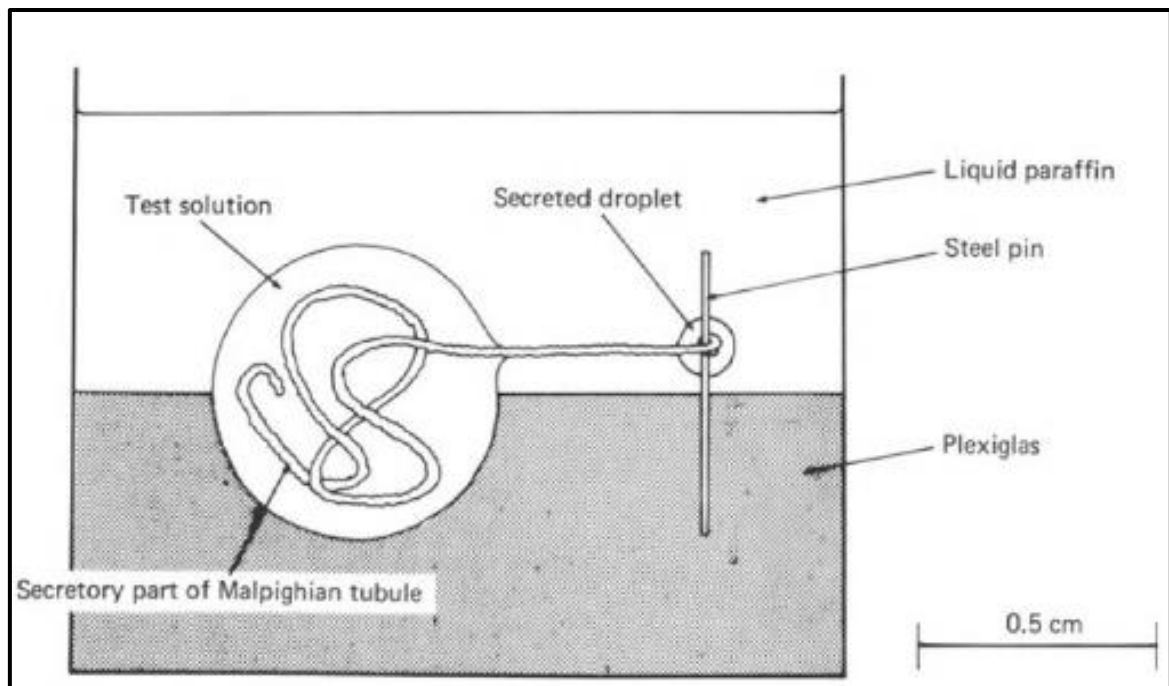


Figura 6.5. El ensayo de Ramsay.

Los segmentos distales de los túbulos de Malpighi se colocan en un baño de solución salina bajo aceite de parafina. El extremo cortado del túbulo se envuelve alrededor de un pasador de acero y se hace una muesca en el segmento bajo aceite. Después de la estimulación con $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ de serotonina en el baño, se producen gotitas secretadas en la muesca y se separan cada 5, 10 ó 20 min. El volumen de fluido producido por el túbulo se calcula usando la fórmula para una esfera. (Madrell, 1980).

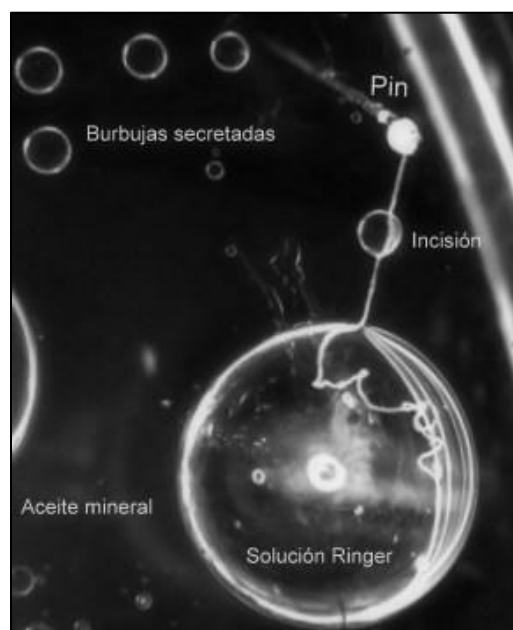


Figura 6.5. Imagen tomada de una burbuja de secreción experimental post estimulación con 5-HT.

6.3.2 Ensayos de transporte de fluidos en intestino anterior.

Para evaluar la tasa de transporte de fluidos a través del intestino anterior se utilizó un protocolo establecido por Ianowski, *et al* 2009. El experimento consistió en microdisectar el intestino anterior de ninfas 5° estadio (5 semanas post alimentación de la ninfa IV) bajo solución salina. Se realizaron 2 lavados de 5 min en agitación suave a fin de eliminar los restos de sangre. Posteriormente, bajo lupa binocular, se ató uno de los extremos del intestino anterior con un hilo de seda. Se inyectaron 50 µl de solución salina coloreada con azul de bromofenol a fin de detectar posibles filtraciones y se ató el extremo opuesto con otra hebra de hilo de seda. Se secó suavemente el tejido con papel absorbente y se pesó en una balanza de precisión (modelo 1207 MP2, Sartorius, Gotinga, Alemania). Finalmente, se incubó el tejido durante 1 hora en una de las siguientes condiciones:

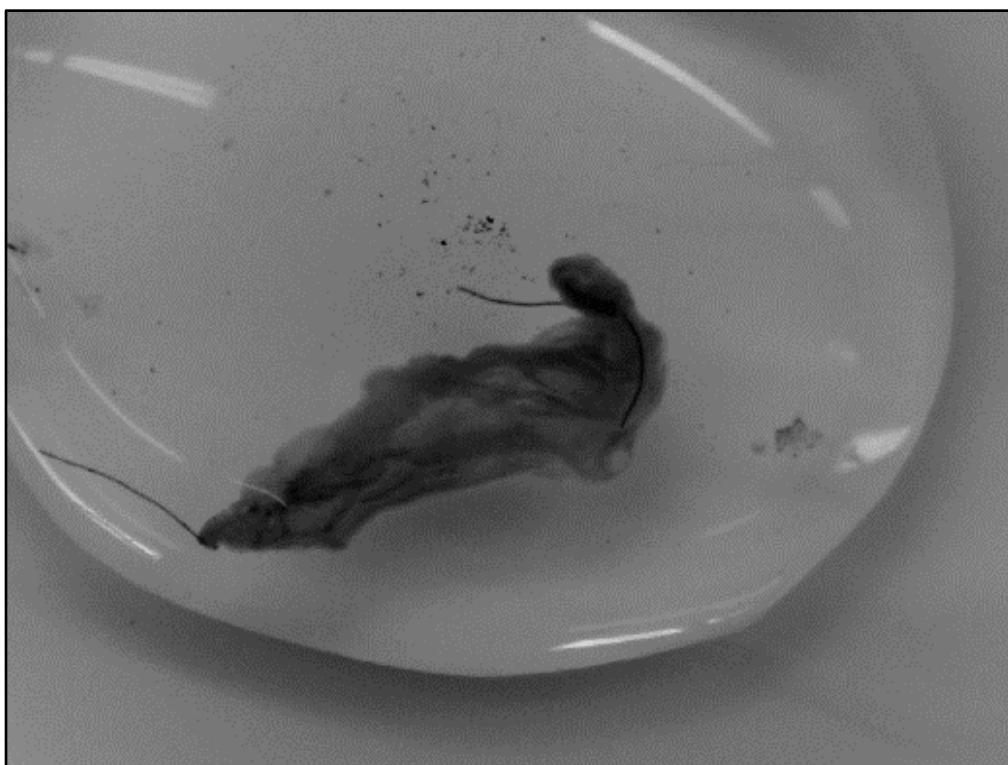
- solución salina (control),
- solución salina con 5-HT (10^{-7} M),
- solución salina con el neuropéptido CCHa (10^{-7} M),
- solución salina con CCHa (10^{-7} M) y 5-HT (10^{-7} M)

El tejido fue extraído del medio de incubación, secado con papel absorbente y pesado en la balanza de precisión. La diferencia “peso inicial- peso final” fue evaluada como parámetro de la tasa de absorción del intestino medio anterior en cada condición. En la **Figura 6.6: A) B) y C)** corresponden a imágenes tomadas durante el experimento luego de la exposición del intestino anterior de distintos insectos a CCHa (10^{-6} M), 5-HT (10^{-7} M) y CCHa (10^{-7} M) y 5-HT (10^{-7} M), respectivamente.

A)



B)



C)

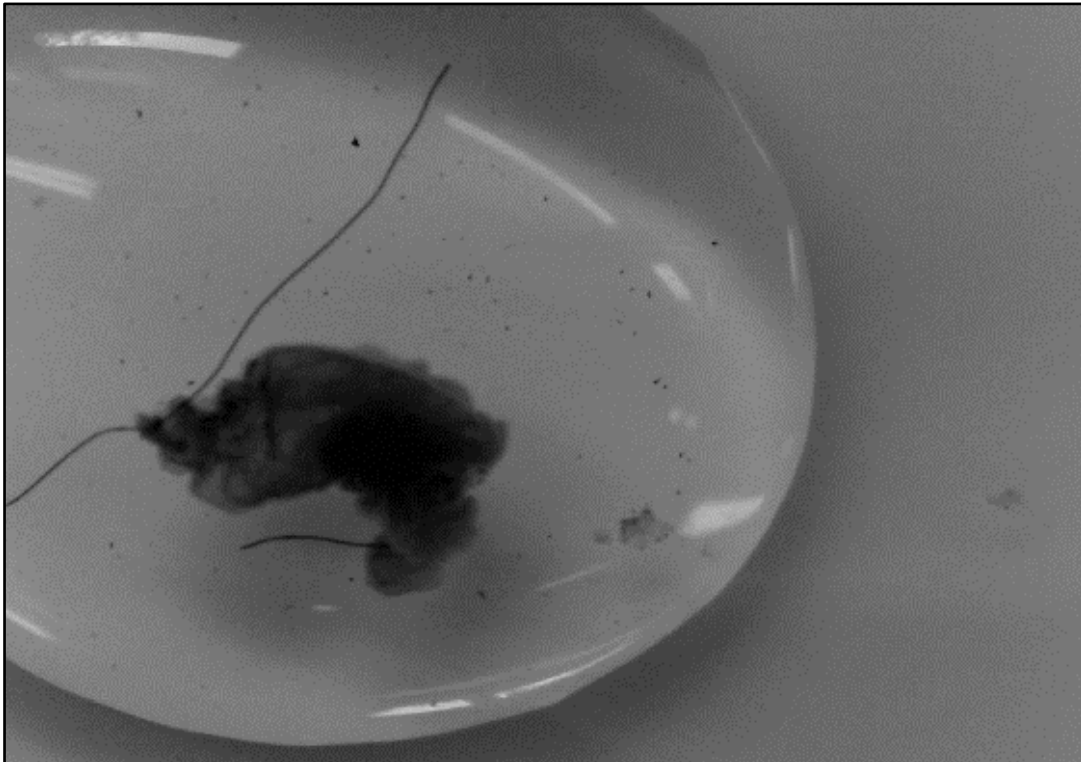


Figura 6.6: Ensayo de transporte de fluidos en intestino anterior: A) CCHa (10^{-6} M), B) 5-HT (10^{-7} M) C) CCHa (10^{-7} M) y 5-HT (10^{-7} M), respectivamente.

6.3.3 Ensayos de contracción de tejidos.

Se utilizaron placas de Petri cubiertas de parafina. Una parte de la parafina fue derretida con un encendedor, y se colocó los insectos con la superficie dorsal hacia arriba. Cuando la parafina se endureció nuevamente, los individuos quedaron fijados a la placa y se les removió la cutícula dorsal con lo que quedaron expuestos los órganos internos. Se cubrió a cada insecto con 90 μ l de solución salina. Se realizaron 4 lavados con solución salina, uno cada 5 min, a fin de estabilizar el tejido. Se midió la cantidad de contracciones de cada tejido expuesto a solución salina durante 30 seg. Luego se removió la solución salina y se colocaron 50 μ l de una nueva solución, a concentraciones crecientes del péptido o del análogo en estudio. En cada caso el número de contracciones observado en aorta, intestino anterior o recto fue contabilizado. El valor de contracciones bajo cada tratamiento fue relativizado al valor de contracciones bajo solución salina (basales).

6.3.4 Estudio de excreción *In vivo*.

Los insectos pertenecientes al grupo control (inyectados con solución salina) y tratado (inyectados con ARNdc específico para el gen *RhoprCCHa*) fueron marcados con pintura acrílica no tóxica (blanco: control, amarillo: tratados). Se pesó cada insecto antes y después de la ingesta de sangre a fin de estimar el volumen de sangre ingerido.

Los insectos de ambos grupos fueron alimentados en forma conjunta, y después de la alimentación fueron separados según tratamiento previo. Se permitió a los insectos alimentarse sobre una gallina durante 20 min. Aquellos que no ingirieron sangre a repleción (distribuidos homogéneamente en ambos grupos experimentales) fueron descartados.

Para estimar el volumen de diuresis postprandial, se rotularon tubos *ependorf* con los números correspondientes a cada insecto y a cada tiempo post alimentación (15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 min). Dentro de cada tubo se colocó un trozo de papel de filtro doblado en forma de acordeón, a fin de que absorba la orina excretada. Se pesó cada tubo con una balanza de precisión y se registró el peso inicial de cada uno de los tubos (peso inicial: pi). Cumplido cada tiempo, los insectos fueron pasados a otro tubo (correspondiente a otro tiempo). Se pesó cada tubo después del paso del insecto (peso final; pf). La diferencia pf - pi, corresponde al peso de orina excretada a cada tiempo por cada insecto.

6.4 Péptidos y análogos peptídicos.

Los péptidos utilizados fueron sintetizados por la empresa GenScript (Piscataway, New Jersey, USA.) y los análogos de sNPF fueron sintetizados y provistos por el laboratorio de la Dra. Ruthann Nichols de la Universidad de Michigan (ver secuencias en Tabla 8.2 de Anexos). Los péptidos y análogos liofilizados fueron conservados a -80°C. Al momento de su utilización fueron disueltos en un *buffer* adecuado según sus propiedades: péptidos ácidos en un *buffer* básico de NH₄OH (<50µl) y péptidos básicos en un *buffer* ácido (10-30 % de ácido acético). En el caso de los péptidos hidrofóbicos, se disolvió en una pequeña cantidad de DMSO (< 10% del volumen final). Para cada péptido se agregó la cantidad de agua tipo *MilliQ* estéril necesaria para llegar a 10⁻³ M. Las soluciones del péptido fueron mantenidas a esta concentración a -20° C. A partir de las

soluciones de esto se realizaron las diluciones de trabajo necesarias con solución salina modificada (ver Anexo soluciones).

6.5 *Análisis estadístico*

Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor o dos factores (con o sin medidas repetidas) o la prueba t de Student, según el caso. Las comparaciones post-hoc se realizaron con la prueba de Tukey Kramer. Una $p \leq 0,05$ fue considerada indicativa de diferencias estadísticamente significativas. Los datos se expresan como medias \pm error estándar. Cuando fue necesario se aplicó transformación logarítmica de los datos a fin de conseguir homogeneidad de varianzas entre los grupos.

Los análisis se llevaron a cabo utilizando el software IBM SPSS Statistics 24.0. Para los gráficos se utilizó el programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, EE. UU.)

7. Referencias

7. Referencias

- ADAMSON, K. J. et al. Molecular insights into land snail neuropeptides through transcriptome and comparative gene analysis. **BMC Genomics**, v. 16, p. 308, Apr 17 2015. ISSN 1471-2164.
- AGUIAR, M.; MASSE, R.; GIBBS, B. F. Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification. **Drug Metab Rev**, v. 37, n. 2, p. 379-404, 2005. ISSN 0360-2532 (Print)
- ALON, M. et al. Multiple origins of pyrethroid resistance in sympatric biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Insect Biochem Mol Biol**, v. 36, n. 1, p. 71-9, Jan 2006. ISSN 0965-1748 (Print) 0965-1748.
- ALVES-BEZERRA, M. et al. Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 69, p. 51-60, Feb 2016. ISSN 1879-0240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26163435> >.
- ALZOGARAY, R. A.; FONTÁN, A.; ZERBA, E. N. Evaluation of hyperactivity produced by pyrethroid treatment on third instar nymphs of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 35, n. 3, p. 323-33, 1997. ISSN 0739-4462. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177136> >.
- ANDRADE, A. Q.; GONTIJO, E. D. [Neonatal screening for congenital Chagas infection: application of latent class analysis for diagnostic test evaluation]. n. 1678-9849 (Electronic), 2008.
- ARAUJO, R. N. et al. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 36, n. 9, p. 683-93, Sep 2006. ISSN 0965-1748. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16935217> >.
- ARAVINDAN, V.; MUTHUKUMARAVEL, S.; GUNASEKARAN, K. Interaction affinity of Delta and Epsilon class glutathione-s-transferases (GSTs) to bind with DDT for detoxification and conferring resistance in *Anopheles gambiae*, a malaria vector. **J Vector Borne Dis**, v. 51, n. 1, p. 8-15, Mar 2014. ISSN 0972-9062 (Print) 0972-9062.
- AUDSLEY, N.; DOWN, R. E. G protein coupled receptors as targets for next generation pesticides. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 67, p. 27-37, Dec 2015. ISSN 0965-1748.
- AUDSLEY, N.; MCINTOSH, C.; PHILLIPS, J. E. Isolation of a neuropeptide from locust corpus cardiacum which influences ileal transport. **J Exp Biol**, v. 173, p. 261-74, Dec 1992. ISSN 0022-0949 (Print)

AUDSLEY, N.; WEAVER, R. J. Neuropeptides associated with the regulation of feeding in insects. **Gen Comp Endocrinol**, v. 162, n. 1, p. 93-104, May 15 2009. ISSN 0016-6480.

AÑEZ, N. et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. **Am J Trop Med Hyg**, v. 60, n. 5, p. 726-32, May 1999. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10344642> >.

BAGGERMAN, G. et al. Peptidomics of the larval *Drosophila melanogaster* central nervous system. **J Biol Chem**, v. 277, n. 43, p. 40368-74, Oct 25 2002. ISSN 0021-9258 (Print)

BALABANIDOU, V. et al., ISSN 33.

BEGUM, K. et al. Functions of ion transport peptide and ion transport peptide-like in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 39, n. 10, p. 717-25, Oct 2009. ISSN 0965-1748.

BELLES, X. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. **Annu Rev Entomol**, v. 55, p. 111-28, 2010. ISSN 0066-4170.

BEND, H. Y. *Metabolic Basis of Detoxication*. 2: 207-228 p. 1982.

BEREZIKOV, E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 12, p. 846-60, Nov 18 2011. ISSN 1471-0056.

BERN, C. Chagas' Disease. **N Engl J Med**, v. 373, n. 5, p. 456-66, Jul 2015. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26222561> >.

BHATT, G. et al. The molecular characterization of the kinin transcript and the physiological effects of kinins in the blood-gorging insect, *Rhodnius prolixus*. **Peptides**, v. 53, p. 148-58, Mar 2014. ISSN 1873-5169.
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23624318> >.

BLANCO, S. B. et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. **Trop Med Int Health**, v. 5, n. 4, p. 293-301, Apr 2000. ISSN 1360-2276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10810029> >.

BOISSON, B. et al. Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. **FEBS Lett**, v. 580, n. 8, p. 1988-92, Apr 3 2006. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793.

BRODY, T.; CRAVCHIK, A. *Drosophila melanogaster* G protein-coupled receptors. **J Cell Biol**, v. 150, n. 2, p. F83-8, Jul 24 2000. ISSN 0021-9525 (Print)

BROGIOLO, W. et al., ISSN 4. An evolutionarily conserved function of the *Drosophilainsulin* receptor and insulin-like peptides in growth control. 2001

BROWN, A. W. Insecticide resistance in arthropods. **Monogr Ser World Health Organ**, v. 38, p. 1-240, 1958. ISSN 0512-3038 (Print)

BURAND, J. P.; HUNTER, W. B. RNAi: future in insect management. *J Invertebr Pathol*, v. 112 Suppl, p. S68-74, Mar 2013. ISSN 0022-2011.

BUXTON, P. A. THE BIOLOGY OF A BLOOD-SUCKING BUG, RHODNIUS PROLIXUS. 1930. ISSN 2.

CALDERÓN-FERNÁNDEZ, G. M. et al. Transcriptome Analysis of the *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Integument. *J Med Entomol*, v. 54, n. 6, p. 1531-1542, Nov 2017. ISSN 1938-2928. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29029205> >.

CAPRIOTTI, N. et al. L925I mutation in the Para-type sodium channel is associated with pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* from the Gran Chaco region. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, n. 1, p. e2659, 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24466362> >.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, v. 136, n. 4, p. 642-55, Feb 20 2009. ISSN 0092-8674.

CARVAJAL, G.; MOUGABURE-CUETO, G.; TOLOZA, A. C. Toxicity of non-pyrethroid insecticides against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 5, p. 675-9, Aug 2012. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850959> >.

CASIDA, J. E. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. 1980.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu Rev Entomol*, v. 58, p. 99-117, 2013. ISSN 0066-4170.

CATTERALL, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, v. 26, n. 1, p. 13-25, Apr 2000. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273.

CECERE, M. C. et al. Reinfestation sources for Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, Argentina. *Emerg Infect Dis*, v. 12, n. 7, p. 1096-102, Jul 2006. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16836826> >.

CERSTIAENS, A. et al. Led-NPF-1 stimulates ovarian development in locusts. *Peptides*, v. 20, n. 1, p. 39-44, 1999. ISSN 0196-9781 (Print) 0196-9781.

CHANG, J. C. et al. Receptor guanylyl cyclases in Inka cells targeted by eclosion hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 106, n. 32, p. 13371-6, Aug 11 2009. ISSN 0027-8424.

CHIANG, R. G.; CHIANG, J. A.; DAVEY, K. G. Morphology of the dorsal vessel in the abdomen of the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus*. *J Morphol*, v. 204, n. 1, p. 923,

Apr 1990. ISSN 0362-2525. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2187100>>.

CHOWANSKI, S. et al. *Cardioregulatory Functions of Neuropeptides and Peptide Hormones in Insects.* **Protein Pept Lett**, v. 23, n. 10, p. 913-931, 2016. ISSN 0929-8665.

CHRISTIE, A. E.; CHI, M. *Prediction of the neuropeptidomes of members of the Astacidea (Crustacea, Decapoda) using publicly accessible transcriptome shotgun assembly (TSA) sequence data.* **Gen Comp Endocrinol**, v. 224, p. 38-60, Dec 2015. ISSN 1095-6840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26070255> >.

CLAUDIANOS, C. et al. *A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee.* **Insect Mol Biol**, v. 15, n. 5, p. 615-36, Oct 2006. ISSN 0962-1075 (Print) 0962-1075.

COAST, G. M. *Neuroendocrine control of ionic homeostasis in blood-sucking insects.* **J Exp Biol**, v. 212, n. Pt 3, p. 378-86, Feb 2009. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151213> >.

COAST, G. M. et al. *Mosquito natriuretic peptide identified as a calcitonin-like diuretic hormone in Anopheles gambiae (Giles).* **J Exp Biol**, v. 208, n. Pt 17, p. 3281-91, Sep 2005. ISSN 0022-0949 (Print) 0022-0949.

COAST, G.M. *Neurohormones implicated in the control of Malpighian tubule secretion in plant sucking heteropterans: The stink bugs Acrosternum hilare and Nezara viridula.* **Peptides**, v. 31, n. 3, p. 468-73, Mar 2010. ISSN 1873-5169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19772880> >.

COAST, G.M. *The Drosophila melanogaster homologue of an insect calcitonin-like diuretic peptide stimulates V-ATPase activity in fruit fly Malpighian tubules.* **J Exp Biol**, v. 204, n. Pt 10, p. 1795-804, May 2001. ISSN 0022-0949 (Print) 0022-0949.

COOPER, G. J., FOWLER, M. Y HUNTER, M. **Chagas Disease, Part 1 . 390** Academic Press: 2011 Pflugers Archiv : European journal of physiology. 442: 243-247 p. 2011.

CORTEZ, M. R.; MONTEIRO, F. A.; NOIREAU, F. *New insights on the spread of Triatoma infestans from Bolivia--implications for Chagas disease emergence in the southern cone.* **Infect Genet Evol**, v. 10, n. 2, p. 350-3, Mar 2010. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060504> >.

COSTA, J.; LORENZO, M. *Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines--Chagas disease vectors.* **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 46-51, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753457> >.

CUETO, G. M.; ZERBA, E.; PICOLLO, M. I. *Biological effect of 1-dodecanol in teneral and post-teneral Rhodnius prolixus and Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae).*

Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 100, n. 1, p. 59-61, Feb 2005. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15867966> >.

DAVIES, T. G. et al. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. **IUBMB Life**, v. 59, n. 3, p. 151-62, Mar 2007. ISSN 1521-6543 (Print) 1521-6543.

DIAS, C. N.; MORAES, D. F. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitol Res**, v. 113, n. 2, p. 565-92, Feb 2014. ISSN 0932-0113.

DIAS y FAU - LARANJA, F. S. et al. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. n. 0009-7322 (Print), 1956.

DIAS, J. C. Ecological aspects of the vectorial control of Chagas' disease in Brazil. n. 0102-311X (Print), 1994.

DIAS, J. C. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives.

Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 102 Suppl 1, p. 11-8, Oct 2007. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17891281> >.

DIAS, J. C. et al. Further evidence of spontaneous cure in human Chagas disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 5, p. 505-6, 2008 Sep-Oct 2008. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19009195> >.

DIAS, J. C.; JEMMIO, A. [About an insecticidal paint for controlling *Triatoma infestans*, in Bolivia]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 1, p. 79-81, 2008 Jan-Feb 2008. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18368277> >.

DIAS, J. C.; SCHOFIELD, C. J. [The control of the transmission by transfusion of Chagas' disease in the Southern Cone Initiative]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, n. 4, p. 373-83, 1998 Jul-Aug 1998. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662965> >.

DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603-12, Jul 2002. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12219120> >.

DILLEN, S. et al. Identification of the short neuropeptide F precursor in the desert locust: evidence for an inhibitory role of sNPF in the control of feeding. **Peptides**, v. 53, p. 134-9, Mar 2014. ISSN 0196-9781.

DIRCKSEN, H. et al. Genomics, transcriptomics, and peptidomics of *Daphnia pulex* neuropeptides and protein hormones. **J Proteome Res**, v. 10, n. 10, p. 4478-504, Oct 2011. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21830762> >.

DONG, K. Insect sodium channels and insecticide resistance. 2007. ISSN 1.

DONG, K. et al.. *Molecular Biology of Insect Sodium Channels and Pyrethroid Resistance*. 2014.

DONINI, A.; O'DONNELL, M. J.; ORCHARD, I. Differential actions of diuretic factors on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*. **J Exp Biol**, v. 211, n. Pt 1, p. 42-8, Jan 2008. ISSN 0022-0949. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18083731> >.

DREXLER, A. L. et al. Molecular characterization and cell-specific expression of an ion transport peptide in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Cell Tissue Res**, v. 329, n. 2, p. 391-408, Aug 2007. ISSN 0302-766X (Print) 0302-766x.

EWER. Target Receptors in the Control of Insect Pests:; Parte 2. 2005.

FABRO, J. et al. Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 2, p. 487-91, Mar 2012. ISSN 1567-7257. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22210132> >.

FARHAN, A. et al. The CCHamide 1 receptor modulates sensory perception and olfactory behavior in starved *Drosophila*. **Sci Rep**, v. 3, p. 2765, Sep 26 2013. ISSN 2045-2322.

FEYEREISEN, R. Insect CYP Genes and P450 Enzymes. **Insect Molecular Biology**, p. 236-316, 2012.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. The molecular genetics of insecticide resistance. **Genetics**, v. 194, n. 4, p. 807-15, Aug 2013. ISSN 1943-2631. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908373> >.

FRANCO-PAREDES, C.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. The unfinished public health agenda of chagas disease in the era of globalization. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 7, p. e470, Jul 2009. ISSN 1935-2735. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19582139> >.

FRONZA, G. et al. Geographical Variation of Deltamethrin Susceptibility of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Argentina With Emphasis on a Resistant Focus in the Gran Chaco. **J Med Entomol**, v. 53, n. 4, p. 880-887, 07 2016. ISSN 1938-2928. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27113106> >.

FURUYA, K. et al. Isolation and characterization of CRF-related diuretic hormones from the whitelined sphinx moth *Hyles lineata*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 30, n. 2, p. 127-33, Feb 2000. ISSN 0965-1748 (Print) 0965-1748.

FURUYA, K.; SCHEGG, K. M.; SCHOOLEY, D. A. Isolation and identification of a second diuretic hormone from *Tenebrio molitor*. **Peptides**, v. 19, n. 4, p. 619-26, 1998. ISSN 0196-9781 (Print)

GEORGHIOU. *Pest resistance to pesticides* 2012.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. *Genetic and Biological Influences in the Evolution of Insecticide Resistance.* 1977. ISSN 3.

GERMANO, M. et al. Fenitrothion: an alternative insecticide for the control of deltamethrin-resistant populations of *Triatoma infestans* in northern Argentina. **Med Vet Entomol**, v. 28, n. 1, p. 21-5, Mar 2014. ISSN 1365-2915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23668748> >.

GERMANO, M.D.; PICOLLO, M. I.; MOUGABURE-CUETO, G. A. Microgeographical study of insecticide resistance in *Triatoma infestans* from Argentina. **Acta Trop**, v. 128, n. 3, p. 561-5, Dec 2013. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23962389> >.

GERMANO, M. D. et al. New findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from the Gran Chaco. **J Med Entomol**, v. 47, n. 6, p. 1077-81, Nov 2010. ISSN 0022-2585. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21175056> >.

GERMANO, M. D. Scientific evidence of three different insecticide-resistant profiles in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina and Bolivia. **J Med Entomol**, v. 49, n. 6, p. 1355-60, Nov 2012. ISSN 0022-2585. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23270163> >.

GERMANO, M. D.; VASSENA, C. V.; PICOLLO, M. I. Autosomal inheritance of deltamethrin resistance in field populations of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from Argentina. **Pest Manag Sci**, v. 66, n. 7, p. 705-8, Jul 2010. ISSN 1526-4998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205232> >.

GONZALEZ-CABRERA, J. et al. Novel Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel of Pyrethroid-Resistant *Varroa destructor* Populations from the Southeastern USA. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155332, 2016. ISSN 1932-6203.

GONZÁLEZ AUDINO, P. et al. Role of enhanced detoxication in a deltamethrin-resistant population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 335-9, May 2004. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273811> >.

GONZÁLEZ-CABRERA, J. et al. Novel Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel of Pyrethroid-Resistant *Varroa destructor* Populations from the Southeastern USA. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155332, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27191597> >.

GROSSO, C. G. et al. Identification of three cytochrome P450 genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans*: Expression analysis in deltamethrin susceptible and resistant populations. **Infect Genet Evol**, v. 44, p. 459-70, 10 2016. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27461853> >.

GUERENSTEIN, P. G.; LAZZARI, C. R. Host-seeking: How triatomines acquire and make use of information to find blood. *Acta Trop*, v. 110, n. 2-3, p. 148-58, May-Jun 2009. ISSN 0001-706x.

GÄDE, G. Regulation of Intermediary Metabolism and Water Balance of Insects by Neuropeptides. *Annual Review of Entomology*, 2004. ISSN 1.

GÜRTLER, R. E. Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104 Suppl 1, p. 52-9, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753458> >.

GÜRTLER, R. E. et al. Effects of topical application of fipronil spot-on on dogs against the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 103, n. 3, p. 298-304, Mar 2009. ISSN 1878-3503. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19004462> >.

GÜRTLER, R. E. Incidence of trypanosoma cruzi infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg*, v. 73, n. 1, p. 95-103, Jul 2005. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16014842> >.

GÜRTLER, R. E. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 41, p. 16194-9, Oct 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17913895> >.

HANSEN, K. K. et al. The *Drosophila* genes CG14593 and CG30106 code for G-protein-coupled receptors specifically activated by the neuropeptides CCHamide-1 and CCHamide-2. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 404, n. 1, p. 184-9, Jan 7 2011. ISSN 0006-291x.

HASELTON, A. T.; YIN, C. M.; STOFFOLANO, J. G., JR. Occurrence of serotonin immunoreactivity in the central nervous system and midgut of adult female *Tabanus nigrovittatus* (Diptera: Tabanidae). *J Med Entomol*, v. 43, n. 2, p. 252-7, Mar 2006. ISSN 0022-2585 (Print).

HAUSER, F. et al. A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. *Prog Neurobiol*, v. 80, n. 1, p. 1-19, Sep 2006. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082.

HAUSER, F. A genome-wide inventory of neurohormone GPCRs in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Front Neuroendocrinol*, v. 29, n. 1, p. 142-65, Jan 2008. ISSN 0091-3022.

HEMINGWAY, J.; MILLER, J.; MUMCUOGLU, K. Y. Pyrethroid resistance mechanisms in the head louse *Pediculus capitis* from Israel: implications for control. 1999. ISSN 1.

HILL, S. J. G-protein-coupled receptors: past, present and future. 2006. ISSN Suppl 1.

HITMI, A.; COUDRET A FAU - BARTHOMEUF, C.; BARTHOMEUF, C. The production of pyrethrins by plant cell and tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* species. n. 1040-9238 (Print), 2000.

HOFER, S.; HOMBERG, U. Evidence for a role of orcokinin-related peptides in the circadian clock controlling locomotor activity of the cockroach *Leucophaea maderae*. **J Exp Biol**, v. 209, n. Pt 14, p. 2794-803, Jul 2006a. ISSN 0022-0949 (Print) 0022-0949.

HOFER, S. Orcokinin immunoreactivity in the accessory medulla of the cockroach *Leucophaea maderae*. **Cell Tissue Res**, v. 325, n. 3, p. 589-600, Sep 2006b. ISSN 0302-766X (Print) 0302-766x.

HOLMAN, G. M.; COOK, B. J.; NACHMAN, R. J. Primary structure and synthesis of a blocked myotropic neuropeptide isolated from the cockroach, *Leucophaea maderae*. **Comp Biochem Physiol C**, v. 85, n. 1, p. 219-24, 1986. ISSN 0742-8413 (Print) 0742-8413.

IANOWSKI, J. P.; CHRISTENSEN, R. J.; O'DONNELL, M. J. Intracellular ion activities in Malpighian tubule cells of *Rhodnius prolixus*: evaluation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport across the basolateral membrane. **J Exp Biol**, v. 205, n. Pt 11, p. 1645-55, Jun 2002. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000809> >.

IANOWSKI, J. P. et al. Feeding is not necessary for triggering plasticization of the abdominal cuticle in haematophagous bugs. **J Insect Physiol**, v. 44, n. 5-6, p. 379-384, May 1998. ISSN 1879-1611. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12770155> >.

IANOWSKI, J. P.; O'DONNELL, M. J. Transepithelial potential in Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*: lumen-negative voltages and the triphasic response to serotonin. **J Insect Physiol**, v. 47, n. 4-5, p. 411-21, Apr 2001. ISSN 1879-1611. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166306> >.

IANOWSKI, J. P. et al. The antidiuretic neurohormone RhoprCAPA-2 downregulates fluid transport across the anterior midgut in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus*. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 3, p. R548-57, Mar 2010. ISSN 1522-1490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007522> >.

IDA, T. et al. Isolation of the bioactive peptides CCHamide-1 and CCHamide-2 from *Drosophila* and their putative role in appetite regulation as ligands for G protein-coupled receptors. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 3, p. 177, 2012. ISSN 1664-2392.

INSAUSTI, T. C. Nervous system of *Triatoma infestans*. **J Morphol**, v. 221, n. 3, p. 343-59, Sep 1994. ISSN 0362-2525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7932774> >.

JOHARD, H. A. et al. Peptidergic clock neurons in *Drosophila*: ion transport peptide and short neuropeptide F in subsets of dorsal and ventral lateral neurons. **J Comp Neurol**, v. 516, n. 1, p. 59-73, Sep 1 2009. ISSN 0021-9967.

KAHSAL, L.; MARTIN, J. R.; WINTHER, A. M. Neuropeptides in the *Drosophila* central complex in modulation of locomotor behavior. **J Exp Biol**, v. 213, n. Pt 13, p. 2256-65, Jul 1 2010. ISSN 0022-0949.

KARATOLOS, N. et al. Mutations in the sodium channel associated with pyrethroid resistance in the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. **Pest Manag Sci**, v. 68, n. 6, p. 834-8, Jun 2012. ISSN 1526-498x.

KATAOKA, H. et al. Identification of an allatotropin from adult *manduca sexta*. **Science**, v. 243, n. 4897, p. 1481-3, Mar 17 1989. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

KAY, I. et al. Isolation, characterization and biological activity of a CRF-related diuretic peptide from *Periplaneta americana* L. **Regul Pept**, v. 42, n. 3, p. 111-22, Dec 11 1992. ISSN 0167-0115 (Print) 0167-0115.

KAY, I. Characterization of a diuretic peptide from *Locusta migratoria*. **Biol Chem Hoppe Seyler**, v. 372, n. 10, p. 929-34, Oct 1991. ISSN 0177-3593 (Print) 0177-3593.

KIM, S. K.; RULIFSON, E. J. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila* corpora cardiaca cells. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 316-20, Sep 16 2004. ISSN 0028-0836.

KIM, Y.-J. et al. A Command Chemical Triggers an Innate Behavior by Sequential Activation of Multiple Peptidergic Ensembles. 2006. ISSN 14.

KIM, Y. J. et al. MIPs are ancestral ligands for the sex peptide receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 14, p. 6520-5, Apr 6 2010. ISSN 0027-8424.

KOGANEMARU, R.; MILLER, D. M.; ADELMAN, Z. N. Robust cuticular penetration resistance in the common bed bug (*Cimex lectularius* L.) correlates with increased steady-state transcript levels of CPR-type cuticle protein genes. 2013. ISSN 3.

KOSTAROPOULOS, I. et al. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 31, n. 4-5, p. 313-9, Mar 15 2001. ISSN 0965-1748 (Print) 0965-1748.

KRIGER, F. L.; DAVEY, K. G. Ovarian motility in mated *Rhodnius prolixus* requires an intact cerebral neurosecretory system. **Gen Comp Endocrinol**, v. 48, n. 1, p. 130-4, Sep 1982. ISSN 0016-6480. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7129081> >.

KWOK, R. et al. The distribution and activity of tachykinin-related peptides in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. **Peptides**, v. 26, n. 1, p. 43-51, Jan 2005. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15626503> >.

LANGE, A. B. et al. The distribution and physiological effects of the myoinhibiting peptides in the kissing bug, *rhodnius prolixus*. **Front Neurosci**, v. 6, p. 98, 2012. ISSN 1662-453X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22783161> >.

LARDEUX, F. et al. Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. **Trop Med Int Health**, v. 15, n. 9, p. 1037-48, Sep 2010. ISSN 1365-3156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20545921> >.

LATORRE-ESTIVALIS, J. M. et al. The molecular sensory machinery of a Chagas disease vector: expression changes through imaginal moult and sexually dimorphic features. **Sci Rep**, v. 7, p. 40049, Jan 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28059141> >.

LAVORE, A. et al. The gap gene giant of *Rhodnius prolixus* is maternally expressed and required for proper head and abdomen formation. **Dev Biol**, v. 361, n. 1, p. 147-55, Jan 2012. ISSN 1095-564X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763688> >.

LEANDER, M. et al. Cardiac contractility structure-activity relationship and ligand-receptor interactions; the discovery of unique and novel molecular switches in myosuppressin signaling. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120492, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25793503> >.

LEE, D.; ORCHARD, I.; LANGE, A. B. Evidence for a conserved CCAP-signaling pathway controlling ecdysis in a hemimetabolous insect, *Rhodnius prolixus*. **Front Neurosci**, v. 7, p. 207, 2013. ISSN 1662-4548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24204330> >.

LEE, D. et al. An unusual myosuppressin from the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. **J Exp Biol**, v. 215, n. Pt 12, p. 2088-95, Jun 2012. ISSN 1477-9145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22623197> >.

LEE, S. H. et al. Mutations in the house fly *Vssc1* sodium channel gene associated with super-kdr resistance abolish the pyrethroid sensitivity of *Vssc1/tipE* sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 29, n. 2, p. 185-94, Feb 1999. ISSN 0965-1748 (Print) 0965-1748.

LI, B. et al. Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Genome Res**, v. 18, n. 1, p. 113-22, Jan 2008. ISSN 1088-9051 (Print) 1088-9051.

LISMONT, E. et al. Molecular cloning and characterization of the allatotropin precursor and receptor in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Front Neurosci**, v. 9, p. 84, 2015. ISSN 1662-4548 (Print) 1662-453x.

LONG, T. F.; MURDOCK, L. L. Stimulation of blowfly feeding behavior by octopaminergic drugs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 13, p. 4159-63, Jul 1983. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

LORENZ, M. W.; KELLNER, R.; HOFFMANN, K. H. Identification of two allatostatins from the cricket, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae): additional members of a family of neuropeptides inhibiting juvenile hormone biosynthesis. **Regul Pept**, v. 57, n. 3, p. 227-36, Jun 27 1995. ISSN 0167-0115 (Print) 0167-0115.

MADDRELL, S. H. EXCRETION IN THE BLOOD-SUCKING BUG, RHODNIUS PROLIXUS STAL. 3. THE CONTROL OF THE RELEASE OF THE DIURETIC HORMONE. **J Exp Biol**, v. 41, p. 459-72, Sep 1964a. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14221042> >.

MADDRELL, S. H. EXCRETION IN THE BLOOD-SUCKING BUG, RHODNIUS PROLIXUS STAL. II. THE NORMAL COURSE OF DIURESIS AND THE EFFECT OF TEMPERATURE. **J Exp Biol**, v. 41, p. 163-76, Mar 1964b. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14161607> >.

MADDRELL, S. H.; GARDINER, B. O. Excretion of alkaloids by malpighian tubules of insects. **J Exp Biol**, v. 64, n. 2, p. 267-81, Apr 1976. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/932618> >.

MADDRELL, S. H.; GEE, J. D. Potassium-induced release of the diuretic hormones of *Rhodnius prolixus* and *Glossina austeni*: Ca dependence, time course and localization of neurohaemal areas. **J Exp Biol**, v. 61, n. 1, p. 155-71, Aug 1974. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4153437> >.

MADDRELL, S. H. et al. 5-Hydroxytryptamine: a second diuretic hormone in *Rhodnius prolixus*. **J Exp Biol**, v. 156, p. 557-66, Mar 1991. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2051136> >.

MADDRELL, S. H. The initial stages in the action of an insecticidal delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on the epithelial cells of the malpighian tubules of the insect, *Rhodnius prolixus*. **J Cell Sci**, v. 90 (Pt 1), p. 131-44, May 1988. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3198707> >.

MADDRELL, S. H.; O'DONNELL, M. J.; CAFFREY, R. The regulation of haemolymph potassium activity during initiation and maintenance of diuresis in fed *Rhodnius prolixus*. **J Exp Biol**, v. 177, p. 273-85, Apr 1993. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8486999> >.

MADDRELL, S. H. et al. Action of activated 27,000 Mr toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on Malpighian tubules of the insect, *Rhodnius prolixus*. **J Cell Sci**, v. 94 (Pt 3), p. 601-8, Nov 1989. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2632587> >.

MADDRELL, S. H. The fate of calcium in the diet of *Rhodnius prolixus*: storage in concretion bodies in the Malpighian tubules. **J Exp Biol**, v. 157, p. 483-502, May 1991. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2061707> >.

MALIK, A.; GADE, G.; LANGE, A. B. Sequencing and biological effects of an adipokinetic/hypertrehalosemic peptide in the stick insect, *Baculum extrudentatum*. **Peptides**, v. 34, n. 1, p. 51-6, Mar 2012. ISSN 0196-9781.

MAMIDALA, P.; JONES, S. C.; MITTAPALLI, O. Metabolic Resistance in Bed Bugs. **Insects**, v. 2, n. 1, p. 36-48, Mar 18 2011. ISSN 2075-4450 (Print) 2075-4450.

MARCINIAK, P. et al. Identification of myotropic neuropeptides from the brain and corpus cardiacum-corpora allata complex of the beetle, *Zophobas atratus*. **J Insect Sci**, v. 10, p. 156, 2010. ISSN 1536-2442.

MARTINEZ-TORRES, D.; DEVONSHIRE, A. L.; WILLIAMSON, M. S. Molecular studies of knockdown resistance to pyrethroids: cloning of domain II sodium channel gene sequences from insects. ISSN 3.

MARTINI, S. V. et al. *Rhodnius prolixus* Malpighian tubule's aquaporin expression is modulated by 5-hydroxytryptamine. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 57, n. 3, p. 133-41, Nov 2004. ISSN 0739-4462. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15484262> >.

MASOOD, M.; ORCHARD, I. Molecular characterization and possible biological roles of allatotropin in *Rhodnius prolixus*. **Peptides**, v. 53, p. 159-71, Mar 2014. ISSN 1873-5169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24177575> >.

MAYORAL, J. G. et al. Allatostatin-C receptors in mosquitoes. **Peptides**, v. 31, n. 3, p. 442-50, Mar 2010. ISSN 0196-9781.

MENSCHAERT, G. et al. Peptidomics coming of age: a review of contributions from a bioinformatics angle. **J Proteome Res**, v. 9, n. 5, p. 2051-61, May 7 2010. ISSN 1535-3893.

MESQUITA, R. D. et al. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 48, p. 14936-41, Dec 2015. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26627243> >.

MILLER, S. C. et al. Dissecting systemic RNA interference in the red flour beetle *Tribolium castaneum*: parameters affecting the efficiency of RNAi. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47431, 2012. ISSN 1932-6203.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104 Suppl 1, p. 17-30, Jul 2009. ISSN 0074-0276.

MORGAN, J. A. et al. Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* associated with resistance to synthetic pyrethroid acaricides. *Int J Parasitol*, v. 39, n. 7, p. 775-9, Jun 2009. ISSN 0020-7519.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. n. 1533-4406 (Electronic),

MORIN, S. et al. Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochem Mol Biol*, v. 32, n. 12, p. 1781-91, Dec 2002. ISSN 0965-1748 (Print) 0965-1748.

MOUGABURE-CUETO, G.; PICOLLO, M. I. Insecticide resistance in vector Chagas disease: evolution, mechanisms and management. *Acta Trop*, v. 149, p. 70-85, Sep 2015. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26003952> >.

NACHMAN, R. J.; HOLMAN, G. M.; COOK, B. J. Active fragments and analogs of the insect neuropeptide leucopyrokinin: structure-function studies. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 137, n. 3, p. 936-42, Jun 30 1986. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, v. 2, n. 4, p. 279-289, Apr 1990. ISSN 1040-4651.

NASSEL, D. R. Serotonin and serotonin-immunoreactive neurons in the nervous system of insects. *Prog Neurobiol*, v. 30, n. 1, p. 1-85, 1988. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082.

NASSEL, D. R. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Prog Neurobiol*, v. 68, n. 1, p. 1-84, Sep 2002. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082.

NASSEL, D. R.; WINTHER, A. M. *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Prog Neurobiol*, v. 92, n. 1, p. 42-104, Sep 2010. ISSN 0301-0082.

NICHOLS, R. FMRFamide-related peptides and serotonin regulate *Drosophila melanogaster* heart rate: mechanisms and structure requirements. *Peptides*, v. 27, n. 5, p. 1130-7, May 2006. ISSN 0196-9781 (Print) 0196-9781.

NOIREAU, F. Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104 Suppl 1, p. 60-4, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753459> >.

NOYES, B. E.; KATZ, F. N.; SCHAFFER, M. H. Identification and expression of the *Drosophila* adipokinetic hormone gene. **Mol Cell Endocrinol**, v. 109, n. 2, p. 133-41, Apr 1 1995. ISSN 0303-7207 (Print) 0303-7207.

O'DONNELL, M. J.; MADDRELL, S. H. Secretion by the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* stal: electrical events. **J Exp Biol**, v. 110, p. 275-90, May 1984. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6379094> >.

O'REILLY, A. O. et al. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. **Biochem J**, v. 396, n. 2, p. 255-63, Jun 1 2006. ISSN 0264-6021.

OAKESHOTT. *Insect Pharmacology: Channels, Receptors, Toxins and Enzymes* 2015.

ONS, S. Neuropeptides in the regulation of *Rhodnius prolixus* physiology. **J Insect Physiol**, v. 97, p. 77-92, 2017 Feb - Mar 2017. ISSN 1879-1611. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27210592> >.

ONS, S.; BELLES, X.; MAESTRO, J. L. Orcokinin contribute to the regulation of vitellogenin transcription in the cockroach *Blattella germanica*. **J Insect Physiol**, v. 82, p. 129-33, Nov 2015. ISSN 0022-1910.

ONS, S. et al. Identification of G protein coupled receptors for opsins and neurohormones in *Rhodnius prolixus*. Genomic and transcriptomic analysis. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 69, p. 34-50, Feb 2016. ISSN 1879-0240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25976540> >.

ONS, S. The neuropeptidome of *Rhodnius prolixus* brain. **Proteomics**, v. 9, n. 3, p. 788-92, Feb 2009. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19137558> >.

ONS, S. Neuropeptide precursor gene discovery in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. **Insect Mol Biol**, v. 20, n. 1, p. 29-44, Feb 2011. ISSN 1365-2583. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20958806> >.

OPPENHOORTH. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. G.A. Kerkut, L.I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 12, Pergamon Press, Oxford 1985.

ORCHARD, I. Serotonin: a coordinator of feeding-related physiological events in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, v. 144, n. 3, p. 316-24, Jul 2006. ISSN 1095-6433. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16377224> >.

ORCHARD, I. et al. The Proctolin Gene and Biological Effects of Proctolin in the Blood-Feeding Bug, *Rhodnius prolixus*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, v. 2, p. 59, 2011. ISSN 1664-2392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22654816> >.

ORCHARD, I.; PALUZZI, J. P. Diuretic and antidiuretic hormones in the blood-gorging bug *Rhodnius prolixus*. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1163, p. 501-3, Apr 2009. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19456399> >.

OVEREND, G. et al. The receptor guanylate cyclase Gyc76C and a peptide ligand, NPLP1-VQQ, modulate the innate immune IMD pathway in response to salt stress. *Peptides*, v. 34, n. 1, p. 209-18, Mar 2012. ISSN 0196-9781.

PALUZZI, J. P. et al. Functional characterization and expression analysis of the myoinhibiting peptide receptor in the Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus*. *Mol Cell Endocrinol*, v. 399, p. 143-53, Jan 2015. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25218475> >.

PALUZZI, J. P. . Isolation, expression analysis, and functional characterization of the first antidiuretic hormone receptor in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 22, p. 10290-5, Jun 2010. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20479227> >.

PALUZZI, J. P. Isolation, cloning, and expression mapping of a gene encoding an antidiuretic hormone and other CAPA-related peptides in the disease vector, *Rhodnius prolixus*. *Endocrinology*, v. 149, n. 9, p. 4638-46, Sep 2008. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511504> >.

PASCUAL, N. et al. Orcokinin in insects and other invertebrates. *Insect Biochem Mol Biol*, v. 34, n. 11, p. 1141-6, Nov 2004. ISSN 0965-1748 (Print) 0965-1748.

PATEL, H. et al. The distribution and physiological effects of three evolutionarily and sequence-related neuropeptides in *Rhodnius prolixus*: Adipokinetic hormone, corazonin and adipokinetic hormone/corazonin-related peptide. *Gen Comp Endocrinol*, v. 195, p. 1-8, Jan 2014. ISSN 1095-6840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184870> >.

PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUÁREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v. 146, n. 1-2, p. 124-37, 2007 Jul-Aug 2007. ISSN 1532-0456. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17052960> >.

PEDRINI, N. et al. Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 3, n. 5, p. e434, 2009. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19434231> >.

PEEFF, N. M.; ORCHARD, I.; LANGE, A. B. The effects of FMRFamide-related peptides on an insect (*Locusta migratoria*) visceral muscle. 1993. ISSN 3.

PESSOA, G. C. et al. Susceptibility characterization of residual Brazilian populations of *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae) to deltamethrin pyrethroid. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 48, n. 2, p. 157-61, 2015 Mar-Apr 2015. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25992929> >.

PHLIPPEN, M. K. et al. Ecdysis of decapod crustaceans is associated with a dramatic release of crustacean cardioactive peptide into the haemolymph. *J Exp Biol*, v. 203, n. Pt 3, p. 521-36, Feb 2000. ISSN 0022-0949 (Print) 0022-0949.

PICOLLO, M. I. et al. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol*, v. 42, n. 4, p. 637-42, Jul 2005. ISSN 0022-2585. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16119553> >.

PORCASI, X. et al. Infestation of rural houses by *Triatoma infestans* in the region of Los Llanos (La Rioja, Argentina). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 1, p. 63-8, Feb 2007. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17294001> >.

PRICE, D. A.; GREENBERG, M. J. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science*, v. 197, n. 4304, p. 670-1, Aug 12 1977. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

QUINLAN, M. C.; TUBLITZ, N. J.; O'DONNELL, M. J. Anti-diuresis in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* Stål: the peptide CAP2b and cyclic GMP inhibit Malpighian tubule fluid secretion. *J Exp Biol*, v. 200, n. Pt 17, p. 2363-7, Sep 1997. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9316268> >.

RASMUSSEN, M. et al. Conserved molecular switch interactions in modeled cardioactive RF-NH2 peptide receptors: Ligand binding and activation. *Peptides*, v. 71, p. 259-67, Sep 2015. ISSN 1873-5169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26211890> >.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *Lancet*, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399979> >.

RAYMOND-DELPECH, V. et al. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert Neurosci*, v. 5, n. 3-4, p. 119-33, Nov 2005. ISSN 1354-2516 (Print) 1354-2516.

REIHER, W. et al. Peptidomics and peptide hormone processing in the *Drosophila* midgut. *J Proteome Res*, v. 10, n. 4, p. 1881-92, Apr 1 2011. ISSN 1535-3893.

REN, G. R. et al. CCHamide-2 Is an Orexigenic Brain-Gut Peptide in *Drosophila*. *PLoS One*, v. 10, n. 7, p. e0133017, 2015. ISSN 1932-6203.

ROCA-ACEVEDO, G.; PICOLLO, M. I.; SANTO-ORIHUELA, P. Expression of insecticide resistance in immature life stages of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol*, v. 50, n. 4, p. 816-8, Jul 2013. ISSN 0022-2585. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23926779> >.

RODITAKIS, E. et al. Identification and detection of indoxacarb resistance mutations in the para sodium channel of the tomato leafminer, *Tuta absoluta*. **Pest Manag Sci**, v. 73, n. 8, p. 1679-1688, Aug 2017. ISSN 1526-498x.

ROLLER, L. et al. The unique evolution of neuropeptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 38, n. 12, p. 1147-57, Dec 2008. ISSN 0965-1748.

ROMERO, A.; POTTER, M. F.; HAYNES, K. F. Behavioral responses of the bed bug to insecticide residues. **J Med Entomol**, v. 46, n. 1, p. 51-7, Jan 2009. ISSN 0022-2585. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19198517> >.

ROSENBAUM, M. B. CHAGASIC MYOCARDIOPATHY. n. 0033-0620 (Print), 1964.

ROSENBAUM M.B FAU - CERISOLA, J. A.; CERISOLA, J. A. [Epidemiology of Chagas' disease in the Argentine Republic]. n. 0018-5469 (Print),

SANO, H. et al. The Nutrient-Responsive Hormone CCHamide-2 Controls Growth by Regulating Insulin-like Peptides in the Brain of *Drosophila melanogaster*. **PLoS Genet**, v. 11, n. 5, p. e1005209, May 2015. ISSN 1553-7390.

SARKIES, P.; MISKA, E. A. Small RNAs break out: the molecular cell biology of mobile small RNAs. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 8, p. 525-35, Aug 2014. ISSN 1471-0072.

SATAKE, H. et al. Insight into tachykinin-related peptides, their receptors, and invertebrate tachykinins: a review. **Zoolog Sci**, v. 20, n. 5, p. 533-49, May 2003. ISSN 0289-0003 (Print) 0289-0003.

SAUME. Introducción a la química y toxicología de insecticidas. Industria grafica Integral. Maracay. Venezuela 1992.

SCARBOROUGH, R. M. et al. Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 17, p. 5575-9, Sep 1984. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

SCHERKENBECK, J.; ZDOBINSKY, T. Insect neuropeptides: structures, chemical modifications and potential for insect control. **Bioorg Med Chem**, v. 17, n. 12, p. 4071-84, Jun 15 2009. ISSN 0968-0896.

SCHOFIELD, C. J. A comparison of sampling techniques for domestic populations of Triatominae. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 72, n. 5, p. 449-55, 1978. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/364782> >.

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. **Adv Parasitol**, v. 42, p. 1-27, 1999. ISSN 0065-308X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10050271> >.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. *The future of Chagas disease control. Trends Parasitol*, v. 22, n. 12, p. 583-8, Dec 2006. ISSN 1471-4922 (Print)

SCHOOFS, L. *et al.* Newly discovered functions for some myotropic neuropeptides in locusts. *Peptides*, v. 22, n. 2, p. 219-27, Feb 2001. ISSN 0196-9781 (Print)

SCOTT, J. G. *et al.* Comparative toxicity of seven insecticides to immature stages of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) and two of its important biological control agents, *Muscidifurax raptor* and *Spalangia cameroni* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J Econ Entomol*, v. 84, n. 3, p. 776-9, Jun 1991. ISSN 0022-0493 (Print)

SEDRA, L.; HADDAD, A. S.; LANGE, A. B. Myoinhibitors controlling oviduct contraction within the female blood-gorging insect, *Rhodnius prolixus*. *Gen Comp Endocrinol*, v. 211, p. 62-8, Jan 2015. ISSN 1095-6840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25482544> >.

SEDRA, L.; LANGE, A. B. The female reproductive system of the kissing bug, *Rhodnius prolixus*: arrangements of muscles, distribution and myoactivity of two endogenous FMRFamide-like peptides. *Peptides*, v. 53, p. 140-7, Mar 2014. ISSN 1873-5169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23598080> >.

SIERRA, I. CAPRIOTTI, N. *et al.* Kdr mutations in *Triatoma infestans* from the Gran Chaco are distributed in two differentiated foci: Implications for pyrethroid resistance management. *Acta Trop*, v. 158, p. 208-13, Jun 2016. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26992297> >.

SILVEIRA, A. C. [Current situation with chagas disease vector control in the Americas]. *Cad Saude Publica*, v. 16 Suppl 2, p. 35-42, 2000. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11119318> >.

SLAMA, K.; SAKAI, T.; TAKEDA, M. Effect of corazonin and crustacean cardioactive peptide on heartbeat in the adult American cockroach (*Periplaneta americana*). *Arch Insect Biochem Physiol*, v. 62, n. 2, p. 91-103, Jun 2006. ISSN 0739-4462 (Print) 0739-4462.

SODERLUND, D. M. Metabolic considerations in pyrethroid design. *Xenobiotica*, v. 22, n. 9-10, p. 1185-94, Sep-Oct 1992. ISSN 0049-8254 (Print) 0049-8254.

SODERLUND, D. M. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Manag Sci*, v. 64, n. 6, p. 610-6, Jun 2008. ISSN 1526-498X (Print) 1526-498x.

SODERLUND, D. M. State-Dependent Modification of Voltage-Gated Sodium Channels by Pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol*, v. 97, n. 2, p. 78-86, Jun 1 2010. ISSN 0048-3575.

SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R. Neurotoxic Actions of Pyrethroid Insecticides. *Annual Review of Entomology*, 1989. ISSN 1.

SODERLUND, D. M.; KNIPPLE, D. C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol*, v. 33, n. 6, p. 563-77, Jun 2003. ISSN 0965-1748 (Print) 0965-1748.

SOSSIN, W. S.; FISHER, J. M.; SCHELLER, R. H. Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging. *Neuron*, v. 2, n. 5, p. 1407-17, May 1989. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273.

SOUTHEY, B. R.; SWEEDLER, J. V.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L. Prediction of neuropeptide cleavage sites in insects. *Bioinformatics*, v. 24, n. 6, p. 815-25, Mar 15 2008. ISSN 1367-4803.

SPARKS, T. C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic Biochem Physiol*, v. 121, p. 122-8, Jun 2015. ISSN 0048-3575.

SPITTAELS, K. et al. Insect neuropeptide F (NPF)-related peptides: isolation from Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) brain. *Insect Biochem Mol Biol*, v. 26, n. 4, p. 375-82, Apr 1996. ISSN 0965-1748 (Print) 0965-1748.

STANGIER, J. et al. Unusual cardioactive peptide (CCAP) from pericardial organs of the shore crab *Carcinus maenas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, n. 2, p. 575-9, Jan 1987. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

STEEL, C. G.; VAFPOULOU, X. Circadian orchestration of developmental hormones in the insect, *Rhodnius prolixus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, v. 144, n. 3, p. 351-64, Jul 2006. ISSN 1095-6433. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702005> >.

STERKEL, M. et al. OKB, a novel family of brain-gut neuropeptides from insects. *Insect Biochem Mol Biol*, v. 42, n. 7, p. 466-73, Jul 2012. ISSN 1879-0240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22480496> >.

STERKEL, M. Functional proteomics of neuropeptidome dynamics during the feeding process of *Rhodnius prolixus*. *J Proteome Res*, v. 10, n. 8, p. 3363-71, Aug 2011. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21699238> >.

SZESZEL-FEDOROWICZ, W. et al. Myotropic effects of new proctolin analogues modified in the position 5 of peptide chain in insects. *Pol J Pharmacol*, v. 53, n. 1, p. 31-8, Jan-Feb 2001. ISSN 1230-6002 (Print) 1230-6002.

TANAKA, Y.,. *Invertebrate Kinins. Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research*, 2016.

TARTAROTTI, E.; CERON, C. R. Ribosomal DNA ITS-1 intergenic spacer polymorphism in triatomines (Triatominae, Heteroptera). **Biochem Genet**, v. 43, n. 7-8, p. 365-73, Aug 2005. ISSN 0006-2928. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16187161> >.

TE BRUGGE, V.; IANOWSKI, J. P.; ORCHARD, I. Biological activity of diuretic factors on the anterior midgut of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. **Gen Comp Endocrinol**, v. 162, n. 1, p. 105-12, May 2009. ISSN 1095-6840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19408362> >.

TE BRUGGE, V. et al. Identification of the elusive peptidergic diuretic hormone in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*: a CRF-related peptide. **J Exp Biol**, v. 214, n. Pt 3, p. 371-81, Feb 2011. ISSN 1477-9145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21228196> >.

TE BRUGGE, V. A. et al. Presence and activity of a Dippu-DH31-like peptide in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. **Peptides**, v. 26, n. 1, p. 29-42, Jan 2005. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15626502> >.

TE BRUGGE, V. A.; ORCHARD, I. Evidence for CRF-like and kinin-like peptides as neurohormones in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. **Peptides**, v. 23, n. 11, p. 1967-79, Nov 2002. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12431735> >.

TE BRUGGE, V. A.; SCHOOLEY, D. A.; ORCHARD, I. The biological activity of diuretic factors in *Rhodnius prolixus*. **Peptides**, v. 23, n. 4, p. 671-81, Apr 2002. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11897386> >.

TERENIUS, O. et al. RNA interference in *Lepidoptera*: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **J Insect Physiol**, v. 57, n. 2, p. 231-45, Feb 2011. ISSN 0022-1910.

TOLOZA, A. C. et al. Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. **J Med Entomol**, v. 45, n. 3, p. 421-6, May 2008. ISSN 0022-2585. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18533435> >.

TORFS, H. et al. Analysis of C-terminally substituted tachykinin-like peptide agonists by means of aequorin-based luminescent assays for human and insect neurokinin receptors. **Biochem Pharmacol**, v. 63, n. 9, p. 1675-82, May 1 2002. ISSN 0006-2952 (Print) 0006-2952.

TRAVERSO, L. et al. Comparative and functional triatomine genomics reveals reductions and expansions in insecticide resistance-related gene families. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 2, p. e0005313, Feb 2017. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28199333> >.

USHERWOOD, P. N. et al. Mutations in DIIS5 and the DIIS4-S5 linker of *Drosophila melanogaster* sodium channel define binding domains for pyrethroids and DDT. **FEBS Lett**, v. 581, n. 28, p. 5485-92, Nov 27 2007. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793.

VAN WIELENDAAELE, P. et al. CRF-like diuretic hormone negatively affects both feeding and reproduction in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31425, 2012. ISSN 1932-6203.

VEENSTRA, J. A. Allatostatin C and its paralog allatostatin double C: the arthropod somatostatins. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 39, n. 3, p. 161-70, Mar 2009. ISSN 1879-0240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19063967> >.

VEENSTRA, J. A.; IDA, T. More *Drosophila* enteroendocrine peptides: Orcokinin B and the CCHamides 1 and 2. **Cell Tissue Res**, v. 357, n. 3, p. 607-21, Sep 2014. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24850274> >.

VILLALOBOS-SAMBUCARO, M. J. et al. Allatostatin-C antagonizes the synergistic myostimulatory effect of allatotropin and serotonin in *Rhodnius prolixus* (Stal). **Gen Comp Endocrinol**, v. 233, p. 1-7, 07 2016. ISSN 1095-6840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27174746> >.

VILLALOBOS-SAMBUCARO, M. J. Allatotropin modulates myostimulatory and cardioacceleratory activities in *Rhodnius prolixus* (Stal). **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124131, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25897783> >.

VINAUGER, C.; LAZZARI, C. R. Circadian modulation of learning ability in a disease vector insect, *Rhodnius prolixus*. **J Exp Biol**, v. 218, n. Pt 19, p. 3110-7, Oct 2015. ISSN 1477-9145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26276862> >.

VOGEL, K. J.; BROWN, M. R.; STRAND, M. R. Phylogenetic investigation of Peptide hormone and growth factor receptors in five dipteran genomes. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 193, 2013. ISSN 1664-2392 (Print) 1664-2392.

VONTAS, J. G. et al. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Biochem J**, v. 362, n. Pt 2, p. 329-37, Mar 1 2002. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021.

WEGENER, C.; GORBASHOV, A. Molecular evolution of neuropeptides in the genus *Drosophila*. **Genome Biol**, v. 9, n. 8, p. R131, 2008. ISSN 1474-7596.

WESTON, D. P. et al. Multiple origins of pyrethroid insecticide resistance across the species complex of a nontarget aquatic crustacean, *Hyaella azteca*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 41, p. 16532-7, Oct 8 2013. ISSN 0027-8424.

WIGGLESWORTH, V. B. *The epicuticle in an insect, Rhodnius prolixus (Hemiptera).* **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 134, n. 875, p. 163-81, Mar 1947. ISSN 0950-1193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20292372> >.

WIGGLESWORTH, V. B. *Distribution of lipid in the lamellate endocuticle of Rhodnius prolixus (Hemiptera).* **J Cell Sci**, v. 19, n. 3, p. 439-57, Dec 1975. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1107337> >.

WIGGLESWORTH, V. B. *Histochemical studies of uric acid in some insects. 3. Excretion of uric acid by the malpighian tubules in Calliphora vicina and Rhodnius prolixus.* **Tissue Cell**, v. 19, n. 2, p. 275-86, 1987. ISSN 0040-8166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18620198> >.

WILCE, M. C. J.; PARKER, M. W., ISSN 1. *Structure and function of glutathione S-transferases.* 1994. ISSN 1.

WULFF, J. P. et al. *Orcokinin neuropeptides regulate ecdysis in the hemimetabolous insect Rhodnius prolixus.* **Insect Biochem Mol Biol**, v. 81, p. 91-102, 02 2017. ISSN 1879-0240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28089691> >.

YEOH, J. G. C. et al. *DINeR: Database for Insect Neuropeptide Research.* **Insect Biochem Mol Biol**, v. 86, p. 9-19, Jul 2017. ISSN 0965-1748.

YOON, K. S. et al. *Biochemical and molecular analysis of deltamethrin resistance in the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae).* **J Med Entomol**, v. 45, n. 6, p. 1092-101, Nov 2008. ISSN 0022-2585 (Print) 0022-2585.

YU, C. H.; POMÈS, R. *Functional dynamics of ion channels: modulation of proton movement by conformational switches.* **J Am Chem Soc**, v. 125, n. 45, p. 13890-4, Nov 2003. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14599229> >.

ZANDAWALA, M. et al. *Identification and characterization of the adipokinetic hormone/corazonin-related peptide signaling system in Rhodnius prolixus.* **FEBS J**, v. 282, n. 18, p. 3603-17, Sep 2015. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26138617> >.

ZANDAWALA, M. et al. *Isolation and functional characterization of calcitonin-like diuretic hormone receptors in Rhodnius prolixus.* **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e82466, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24312424> >.

ZANDAWALA, M.; PALUZZI, J. P.; ORCHARD, I. *Isolation and characterization of the cDNA encoding DH(31) in the kissing bug, Rhodnius prolixus.* **Mol Cell Endocrinol**, v. 331, n. 1, p. 79-88, Jan 2011. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20797422> >.

ZDAREK, J.; NACHMAN, R. J.; DENLINGER, D. L. *Parturition hormone in the tsetse Glossina morsitans: activity in reproductive tissues from other species and response of*

tsetse to identified neuropeptides and other neuroactive compounds. J Insect Physiol, v. 46, n. 3, p. 213-9, Mar 2000. ISSN 0022-1910 (Print) 0022-1910.

ZERBA, E. N. Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina (B Aires)*, v. 59 Suppl 2, p. 41-6, 1999. ISSN 0025-7680. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10668241> >.

ZITNAN, D.; ADAMS, M. E.,. Neuroendocrine regulation of ecdysi. *in: Gilbert, L.I. (Ed.), Insect Endocrinology. Academic Press, London, pp. 253–309, 2012.*

8. Anexos

8.1 Tabla de oligonucleótidos

Oligonucleótido	Especie	Secuencia (5' a 3')	Temperatura de hibridación (°C)
TiNa Fwd	<i>Triatoma infestans</i>	TGGCCAACATTGAATTTATTGATATC	52
KDR Cont Rev	<i>Triatoma infestans</i>	TTAACCCGAACAAGAATATA	52
Cont Fwd	<i>Triatoma infestans</i>	CCAACATTGAATTTATTGATATC	52
KDR Mut Fwd	<i>Triatoma infestans</i>	CAACAGTAGTTATAGGAAATTTT	52
KDRWtRev	<i>Triatoma infestans</i>	AAATATATAAAGTACTTACAAC	52
KDRMutDegFw	<i>Triatoma infestans</i>	CAACAGTAGTTATAGGAAATGTT	52
KDRWtDegRv	<i>Triatoma infestans</i>	AAATATATAAAGTACTTACAgCT	52
CCH-aRpFwd	<i>Rhodnius prolixus</i>	TACGATCCAGGGACACCAT	50
CCH-aRpRev	<i>Rhodnius prolixus</i>	CATGGACGGTGAGCAGTAAG	50
rCCHa7766RpFwd	<i>Rhodnius prolixus</i>	CAGAGAATGCTATCACAGTCATACC	51
rCCHa7766RpRev	<i>Rhodnius prolixus</i>	GACGAGGAATATCACAGCGAATAC	51
rCCHa608RpFwd	<i>Rhodnius prolixus</i>	TAAGCAACGTAGAAGAATACACAC	51
rCCHa608RpRev	<i>Rhodnius prolixus</i>	ACACCGACTAGGAACATCAC	51
CCH-aRNAiRproRev	<i>Rhodnius prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCCTTTGAAA GCGGCTCCAT	50
CCH-aRNAiRproFwd	<i>Rhodnius prolixus</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCGGCTCTGT AGATCGTTCTCT	50
T7 full	*	ATAGAATTCTCTCTAGAAGCTTAATACGA CTCACTATAGGG	50

8.2 Tabla de Péptidos y Análogos

Péptido/Análogo peptídico	Secuencia
Miosupresina	pyro-EDVDHVFLRF-amida
Hormona Adipokinética	QLTFSTDW
CCH amida	GGCSAFGHSCFGGH-amida
OKA	NFDEIDRVGFGSFI
OKB	EFLDPLGGGHLI
Alatotropina	NVQLSTARGF-amida
Neuropeptide like precursor 1	YVATLLRQ-amida
Ion Transport peptide B	GPSSRLVLSHPLN
sNPF	NNRSPQLRLRF-amida
sNPF [3-11]	SPQLRLRF-NH ₂
sNPF [4-11]	PQLRLRF-NH ₂
Takikinina	ASGFFGMR

8.3 Buffers y soluciones utilizados

1. Soluciones utilizadas para electroforesis.

Buffer TBE 3X:

-Tris 0.25M

-Ácido bórico 0.25M

-Na₂EDTA pH=8 6mM

Buffer de siembra

-Tris 0.5M

-Glicerol 40%.

-Colorantes: xilen cianol FF y azul de bromofenol.

Bromuro de Etidio (Br Et): la solución de stock tenía una concentración 10mg/ml, y se almacenó en oscuridad en heladera a 4° C.

2. Soluciones utilizadas para clonado.

Medio de cultivo Luria Bertani (LB):

Para preparar un litro de LB líquido se utilizó:

-Bactotripton 10 gr.

-Extracto de levadura 5 gr.

-NaCl 5 gr.

LB – agar: se agregaron 15 gramos de agar por cada litro de LB líquido preparado.

Antibiótico ampicilina: se diluyó la solución de stock 1000 veces hasta alcanzar una concentración 50 mg/ml. Se esterilizó por filtración.

3. Soluciones para la preparación de ADN plásmido.

Buffer TELT

-Tris/HCl 50 mM pH: 7,5

-EDTA 62, 5 mM p+H: 8

-LiCl 2, 5 M

-Tritón X-100 4%

Lisozima (Sigma-Aldrich): Concentración final: 10 mg/ml en Tris/HCl 10mM pH: 8

Los medios y soluciones fueron esterilizados mediante el proceso de autoclave a 121°C a 1 atmósfera de sobrepresión. Para las soluciones se utilizó agua milliQ, que fue esterilizada en autoclave según la necesidad.

4. Soluciones utilizadas para disecciones y técnicas de fisiología.

Solución salina: para las disecciones y ensayos de fisiología se utilizó solución salina similar en composición y propiedades a las de la hemolinfa de los insectos NaCl, 129 mM; KCl, 8.6 mM; CaCl₂ 2.0 mM; MgCl₂ 8.5 mM; NaHCO₃ 10.2 mM; NaH₂PO₄ 4.3 mM; Hepes 8.6 mM, PH 7. Posteriormente, esterilizó la solución mediante filtración con filtros de 2 µm.

Abreviaturas

5-HT: Serotonina

ABN: Nervios Abdominales

AchEs: Acetilcolinesterasas

AcNa: Acetato de Sodio

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AKH: Hormona Adipokinética

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNi: ARN de interferencia

ARNm: ARN mensajero

ATP: Alatotropina

BrEt: Bromuro de Etidio

CA: *Corpora Allata*

CC: *Corpora Cardiac*

CCAP: Péptido Cardioactivo de Crustáceos

CCE: Carboxilesterasas

CCHa: CCHamida

CO₂: Dióxido de Carbono

CYP: Citocromo

CZ: Corazonina

DDT: 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano

DNS: Células Neurosecretoras Dorsales;

dNTP's: Desoxiribonucleotidos

DUM: Neuronas Dorsomediales Desapareadas

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EH: Hormona de la Eclosión

ETH: Hormona disparadora de la Ecdisis

FaRPs: Superfamilia de péptidos RF-amida

GPCR: Receptor Acoplado a Proteína G

GSH: glutatión reducido

GST: Glutatión S Transferasa

ICS: Iniciativa de los Países del Cono Sur

IHQ: Inmunohistoquímica

ILPs: Péptidos símil-insulina

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido

IRAC: *Insecticide Resistance Action Committee*

ITP: Péptido Transportador de Iones

kdr: knockdown resistance

L: O: Luz:Oscuridad

LANS: Neuronas Anteriores Laterales

LD50: Dosis Letal 50

MEPRA: Misión de Estudios de Patología Regional Argentina

MIV: Manejo Integrado de Vectores

MNS: Células Neurosecretoras Mediales

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem

MSP: Miosupresina

MTGM: Ganglio Mesometatoraxico

NPLP1: *Neuropeptide-like precursor 1* o Precursor de Neuropéptidos 1

NSCs: Células Neurosecretoras

OK's: Orcokinas

OKA: Orcokinina A

OKB: Orcokinina B

OKC: Orcokinina C

OPS: Organización Panamericana de la Salud

pb: pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PL: *Pars lateralis*

RR: Tasa de Resistencia

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SK: Sulfakininas

SNC: Sistema Nervioso Central

sNPF: Short Neuropeptide F o Neuropéptido F corto

WHO/OMS: Organización Mundial de la Salud

Wt: *Wild type*

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

